

Aus dem Zentrum für Orthopädie und Unfallchirurgie des Universitätsklinikums
Gießen und Marburg, Standort Marburg
(Geschäftsführender Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Steffen Ruchholtz
Medizinische Direktorin: Univ.-Prof. Dr. med. Susanne Fuchs-Winkelmann)
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**„Interaktion und Einwachsverhalten von Sehnen- und Knochenzellen:
quantitative und qualitative Änderungen der Genexpression
sehnenspezifischer Gene im Ko-Kulturmodell nach Gabe von BMP2 bzw.
BMP7“**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten
Humanmedizin dem Fachbereich Medizin der Philipps Universität Marburg
vorgelegt von:

Martin Kilian Oswald

aus Speyer

Köln 2021

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekanin: Prof. Dr. Denise Hilfer-Kleiner

Referent: Prof. Dr. Philipp Lechler

1. Korreferent: Prof. Dr. Ralf Kinscherf

Gewidmet meinem Vater

Rudolf Josef Oswald (* 25.06.1953 - † 08.07.2015)

Inhaltverzeichnis

1. Abkürzungs-, Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	1
1.1. Abkürzungsverzeichnis.....	1
1.2. Abbildungsverzeichnis	2
1.3. Tabellenverzeichnis	7
2. Einleitung.....	10
2.1. Rupturen des vorderen Kreuzbandes.....	10
2.1.1. Epidemiologie von Rupturen des vorderen Kreuzbandes.....	10
2.1.2. Anatomie des vorderen Kreuzbandes.....	11
2.1.3. Ätiologie der Ruptur des vorderen Kreuzbandes	13
2.1.4. Symptomatik und Diagnostik der Ruptur des vorderen Kreuzbandes	14
2.1.6. Versagen von vorderen Kreuzbandersatzplastiken	16
2.2. Transplantateinheilung und Knochen-Sehneninteraktion	18
2.3.1. Historie und Übersicht.....	21
2.3.2. Molekularstruktur und Signalwege der BMPs	23
2.3.4. BMP7	27
2.4. Kollagene	29
2.4.1. Übersicht	29
2.4.2. Kollagen Typ I Alpha I (COL1A1).....	30
2.4.3. Kollagen Typ I Alpha II (COL1A2).....	31
2.4.4. Kollagen Typ V Alpha I (COL5A1)	32
2.5. Decorin (DCN)	33
2.6. Fibromodulin (FMOD)	34
2.7. Mohawk Homebox Transkriptionsfaktor (MKX)	35
2.8. Fragestellung und Ziele dieser Arbeit.....	36
3. Material und Methodik	38
3.1. Materialien	38

3.1.1. Einmalprodukte	38
3.1.2. Chemikalien	39
3.1.3. Geräte	41
3.2. Methodik	42
3.2.1. Ko-Kultur und mRNA-Gewinnung in den Vorgängerprojekten.....	42
3.2.2. Durchgeführte Methodik.....	47
3.2.2.1. cDNA Synthese	47
3.2.2.2. Quantitative Real-Time PCR	49
3.2.3. Auswertung und Statistik.....	56
4. Ergebnisse	57
4.1. Expression von COL1A1	57
4.1.1. Singuläre Stimulation mit BMP2.....	57
4.1.2. Multiple Stimulation mit BMP2	62
4.1.3. Singuläre Stimulation mit BMP7.....	66
4.1.4. Multiple Stimulation mit BMP7	70
4.2. Expression von COL1A2	74
4.2.1. Singuläre Stimulation mit BMP2.....	74
4.2.2. Multiple Stimulation mit BMP2	79
4.2.3. Singuläre Stimulation mit BMP7.....	83
4.2.4. Multiple Stimulation mit BMP7	87
4.3. Expression von COL5A1	91
4.3.1. Singuläre Stimulation mit BMP2.....	91
4.3.2. Multiple Stimulation mit BMP2	95
4.3.3. Singuläre Stimulation mit BMP7.....	99
4.3.4. Multiple Stimulation mit BMP7	103
4.4. Expression von DCN	107
4.4.1. Singuläre Stimulation mit BMP2.....	107
4.4.2. Multiple Stimulation mit BMP2	111
4.4.3. Singuläre Stimulation mit BMP7.....	115
4.4.4. Multiple Stimulation mit BMP7	119

4.5. Expression von FMOD.....	123
4.5.1. Singuläre Stimulation mit BMP2.....	123
4.5.2. Multiple Stimulation mit BMP2	127
4.5.3. Singuläre Stimulation mit BMP7	131
4.5.4. Multiple Stimulation mit BMP7	135
4.6. Expression von MKX	139
4.6.1. Singuläre Stimulation mit BMP2.....	139
4.6.2. Multiple Stimulation mit BMP2	143
4.6.3. Singuläre Stimulation mit BMP7	147
4.6.4. Multiple Stimulation mit BMP7	151
5. Diskussion	155
5.1. Einleitung in die Diskussion	155
5.2. Interpretation der Ergebnisse nach singulärer Stimulation mit BMP2 ..	157
5.3. Interpretation der Ergebnisse nach multipler Stimulation mit BMP2.....	159
5.4. Interpretation der Ergebnisse nach singulärer Stimulation mit BMP7 ..	161
5.5. Interpretation der Ergebnisse nach multipler Stimulation mit BMP7.....	163
5.6. Ausblick und Zusammenfassung der Ergebnisse.....	164
5.7. Limitationen dieser Arbeit	168
6. Zusammenfassung.....	170
7. Abstract	172
8. Literaturverzeichnis	174
9. Liste der Akademischen Lehrer.....	197
10. Danksagung	198

1. Abkürzungs-, Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

1.1. Abkürzungsverzeichnis

ACTB = Actinin Beta

ActRII = Activin Typ II Rezeptor

ActRIIB = Activin Typ IIB Rezeptor

ALK2 = Activin Receptor-like Kinase 2

ALK3 = Activin Receptor-like Kinase 3

BMP = Bone Morphogenetic Protein

BMPIA = BMP Typ IA Rezeptor

BMPIB = BMP Typ IB Rezeptor

BMPII = BMP Typ II Rezeptor

cDNA = complementary Desoxyribonucleic Acid

COL1A1 = Kollagen Typ I, Alpha I

COL1A2 = Kollagen Typ I, Alpha II

COL5A1 = Kollagen Typ V, Alpha I

COL5A2 = Kollagen Typ V, Alpha II

COL5A3 = Kollagen Typ V Alpha III

DCN = Decorin

FDA = Food and Drug Administration

FGF2 = Fibroblast Growth Factor 2

FMOD = Fibromodulin

HPRT = Hypoxantin-Guanin-Phosphorybosyltransferase

I-Smads = Inhibitor-Smads

MKX = Mohawk Homebox Transkriptionsfaktor

mRNA = messenger Ribonucleic Acid

NO = Stickstoffmonoxid

Osx = Osterix

PCR = Polymerase Chain Reaction

RE = Relative Expression

R-Smads = Rezeptor-Smads

Runx2 = Runt-related Transkriptionsfaktor 2

TGF- β = Transforming Growth Factor β

TNF = Tumornekrosefaktor

VEGF = Vascular Endothelial Growth Factor

1.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung intrazellulärer Signalwege nach BMP
Rezeptoraktivierung

Abbildung 2: Graphische Darstellung des Ablaufs der Ko-Kultivierung

Abbildung 3: Plattenschema für nicht stimulierte Proben

Abbildung 4: Plattenschema für alle mit 100ng/ml stimulierten Proben

Abbildung 5: Plattenschema für alle mit 250ng/ml stimulierten Proben

Abbildung 6: Plattenschema für alle mit 500ng/ml stimulierten Proben

Abbildung 7: Graphische Darstellung der Expression von COL1A1 nach drei
Tagen singulärer Stimulation mit BMP2

Abbildung 8: Graphische Darstellung der Expression von COL1A1 nach sieben
Tagen singulärer Stimulation mit BMP2

Abbildung 9: Graphische Darstellung der Expression von COL1A1 nach zehn
Tagen singulärer Stimulation mit BMP2

Abbildung 10: Graphische Darstellung der Expression von COL1A1 nach drei
Tagen multipler Stimulation mit BMP2

Abbildung 11: Graphische Darstellung der Expression von COL1A1 nach
sieben Tagen multipler Stimulation mit BMP2

Abbildung 12: Graphische Darstellung der Expression von COL1A1 nach zehn
Tagen multipler Stimulation mit BMP2

Abbildung 13: Graphische Darstellung der Expression von COL1A1 nach drei
Tagen singulärer Stimulation mit BMP7

Abbildung 14: Graphische Darstellung der Expression von COL1A1 nach sieben Tagen sigulärer Stimulation mit BMP7

Abbildung 15: Graphische Darstellung der Expression von COL1A1 nach zehn Tagen singulärer Stimulation mit BMP7

Abbildung 16: Graphische Darstellung der Expression von COL1A1 nach drei Tagen multipler Stimulation mit BMP7

Abbildung 17: Graphische Darstellung der Expression von COL1A1 nach sieben Tagen multipler Stimulation mit BMP7

Abbildung 18: Graphische Darstellung der Expression von COL1A1 nach zehn Tagen multipler Stimulation mit BMP7

Abbildung 19: Graphische Darstellung der Expression von COL1A2 nach drei Tagen singulärer Stimulation mit BMP2

Abbildung 20: Graphische Darstellung der Expression von COL1A2 nach sieben Tagen singulärer Stimulation mit BMP2

Abbildung 21: Graphische Darstellung der Expression von COL1A2 nach zehn Tagen singulärer Stimulation mit BMP2

Abbildung 22: Graphische Darstellung der Expression von COL1A2 nach drei Tagen multipler Stimulation mit BMP2

Abbildung 23: Graphische Darstellung der Expression von COL1A2 nach sieben Tagen multipler Stimulation mit BMP2

Abbildung 24: Graphische Darstellung der Expression von COL1A2 nach zehn Tagen multipler Stimulation mit BMP2

Abbildung 25: Graphische Darstellung der Expression von COL1A2 nach drei Tagen singulärer Stimulation mit BMP7

Abbildung 26: Graphische Darstellung der Expression von COL1A2 nach sieben Tagen singulärer Stimulation mit BMP7

Abbildung 27: Graphische Darstellung der Expression von COL1A2 nach zehn Tagen singulärer Stimulation mit BMP7

Abbildung 28: Graphische Darstellung der Expression von COL1A2 nach drei Tagen multipler Stimulation mit BMP7

Abbildung 29: Graphische Darstellung der Expression von COL1A2 nach sieben Tagen multipler Stimulation mit BMP7

Abbildung 30: Graphische Darstellung der Expression von COL1A2 nach zehn Tagen multipler Stimulation mit BMP7

Abbildung 31: Graphische Darstellung der Expression von COL5A1 nach drei Tagen singulärer Stimulation mit BMP2

Abbildung 32: Graphische Darstellung der Expression von COL5A1 nach sieben Tagen singulärer Stimulation mit BMP2

Abbildung 33: Graphische Darstellung der Expression von COL5A1 nach zehn Tagen singulärer Stimulation mit BMP2

Abbildung 34: Graphische Darstellung der Expression von COL5A1 nach drei Tagen multipler Stimulation mit BMP2

Abbildung 35: Graphische Darstellung der Expression von COL5A1 nach sieben Tagen multipler Stimulation mit BMP2

Abbildung 36: Graphische Darstellung der Expression von COL5A1 nach zehn Tagen multipler Stimulation mit BMP2

Abbildung 37: Graphische Darstellung der Expression von COL5A1 nach drei Tagen singulärer Stimulation mit BMP7

Abbildung 38: Graphische Darstellung der Expression von COL5A1 nach sieben Tagen singulärer Stimulation mit BMP7

Abbildung 39: Graphische Darstellung der Expression von COL5A1 nach zehn Tagen singulärer Stimulation mit BMP7

Abbildung 40: Graphische Darstellung der Expression von COL5A1 nach drei Tagen multipler Stimulation mit BMP7

Abbildung 41: Graphische Darstellung der Expression von COL5A1 nach sieben Tagen multipler Stimulation mit BMP7

Abbildung 42: Graphische Darstellung der Expression von COL5A1 nach zehn Tagen multipler Stimulation mit BMP7

Abbildung 43: Graphische Darstellung der Expression von DCN nach drei Tagen singulärer Stimulation mit BMP2

Abbildung 44: Graphische Darstellung der Expression von DCN nach sieben Tagen singulärer Stimulation mit BMP2

Abbildung 45: Graphische Darstellung der Expression von DCN nach zehn Tagen singulärer Stimulation mit BMP2

Abbildung 46: Graphische Darstellung der Expression von DCN nach drei Tagen multipler Stimulation mit BMP2

Abbildung 47: Graphische Darstellung der Expression von DCN nach sieben Tagen multipler Stimulation mit BMP2

Abbildung 48: Graphische Darstellung der Expression von DCN nach zehn Tagen multipler Stimulation mit BMP2

Abbildung 49: Graphische Darstellung der Expression von DCN nach drei Tagen singulärer Stimulation mit BMP7

Abbildung 50: Graphische Darstellung der Expression von DCN nach sieben Tagen singulärer Stimulation mit BMP7

Abbildung 51: Graphische Darstellung der Expression von DCN nach zehn Tagen singulärer Stimulation mit BMP7

Abbildung 52: Graphische Darstellung der Expression von DCN nach drei Tagen multipler Stimulation mit BMP7

Abbildung 53: Graphische Darstellung der Expression von DCN nach sieben Tagen multipler Stimulation mit BMP7

Abbildung 54: Graphische Darstellung der Expression von DCN nach zehn Tagen multipler Stimulation mit BMP7

Abbildung 55: Graphische Darstellung der Expression von FMOD nach drei Tagen singulärer Stimulation mit BMP2

Abbildung 56: Graphische Darstellung der Expression von FMOD nach sieben Tagen singulärer Stimulation mit BMP2

Abbildung 57: Graphische Darstellung der Expression von FMOD nach zehn Tagen singulärer Stimulation mit BMP2

Abbildung 58: Graphische Darstellung der Expression von FMOD nach drei Tagen multipler Stimulation mit BMP2

Abbildung 59: Graphische Darstellung der Expression von FMOD nach sieben Tagen multipler Stimulation mit BMP2

Abbildung 60: Graphische Darstellung der Expression von FMOD nach zehn Tagen multipler Stimulation mit BMP2

Abbildung 61: Graphische Darstellung der Expression von FMOD nach drei Tagen singulärer Stimulation mit BMP7

Abbildung 62: Graphische Darstellung der Expression von FMOD nach sieben Tagen singulärer Stimulation mit BMP7

Abbildung 63: Graphische Darstellung der Expression von FMOD nach zehn Tagen singulärer Stimulation mit BMP7

Abbildung 64: Graphische Darstellung der Expression von FMOD nach drei Tagen multipler Stimulation mit BMP7

Abbildung 65: Graphische Darstellung der Expression von FMOD nach sieben Tagen multipler Stimulation mit BMP7

Abbildung 66: Graphische Darstellung der Expression von FMOD nach zehn Tagen multipler Stimulation mit BMP7

Abbildung 67: Graphische Darstellung der Expression von MKX nach drei Tagen singulärer Stimulation mit BMP2

Abbildung 68: Graphische Darstellung der Expression von MKX nach sieben Tagen singulärer Stimulation mit BMP2

Abbildung 69: Graphische Darstellung der Expression von MKX nach zehn Tagen singulärer Stimulation mit BMP2

Abbildung 70: Graphische Darstellung der Expression von MKX nach drei Tagen multipler Stimulation mit BMP2

Abbildung 71: Graphische Darstellung der Expression von MKX nach sieben Tagen multipler Stimulation mit BMP2

Abbildung 72: Graphische Darstellung der Expression von MKX nach zehn Tagen multipler Stimulation mit BMP2

Abbildung 73: Graphische Darstellung der Expression von MKX nach drei Tagen singulärer Stimulation mit BMP7

Abbildung 74: Graphische Darstellung der Expression von MKX nach sieben Tagen singularer Stimulation mit BMP7

Abbildung 75: Graphische Darstellung der Expression von MKX nach zehn Tagen singularer Stimulation mit BMP7

Abbildung 76: Graphische Darstellung der Expression von MKX nach drei Tagen multipler Stimulation mit BMP7

Abbildung 77: Graphische Darstellung der Expression von MKX nach sieben Tagen multipler Stimulation mit BMP7

Abbildung 78: Graphische Darstellung der Expression von MKX nach zehn Tagen multipler Stimulation mit BMP7

1.3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die BMP-Familie

Tabelle 2: Untergruppen innerhalb der BMP-Familie

Tabelle 3: Verwendete Geräte

Tabelle 4: Stimulationsschemata der einzelnen Läufe

Tabelle 5: Zuordnung der Proben zum Biologischen Set

Tabelle 6: Berechnungsschema der für die cDNA Synthese benötigten Menge an Reaktionslösungen

Tabelle 7: Inkubationsprotokoll der cDNA Synthese

Tabelle 8: Pipettierschema für Mastermix mit Primern von Sigma-Aldrich

Tabelle 9: Pipettierschema für Mastermix mit Primern von Qiagen

Tabelle 10: Konzentrationen der Standardreihe

Tabelle 11: Programm der Real-Time PCR

Tabelle 12: Relative Expression von COL1A1 nach singularer Stimulation mit BMP2

Tabelle 13: Relative Expression von COL1A1 nach multipler Stimulation mit BMP2

Tabelle 14: Relative Expression von COL1A1 nach singularer Stimulation mit BMP7

Tabelle 15: Relative Expression von COL1A1 nach multipler Stimulation mit BMP7

Tabelle 16: Relative Expression von COL1A2 nach singulärer Stimulation mit BMP2

Tabelle 17: Relative Expression von COL1A2 nach multipler Stimulation mit BMP2

Tabelle 18: Relative Expression von COL1A2 nach singulärer Stimulation mit BMP7

Tabelle 19: Relative Expression von COL1A2 nach multipler Stimulation mit BMP7

Tabelle 20: Relative Expression von COL5A1 nach singulärer Stimulation mit BMP2

Tabelle 21: Relative Expression von COL5A1 nach multipler Stimulation mit BMP2

Tabelle 22: Relative Expression von COL5A1 nach singulärer Stimulation mit BMP7

Tabelle 23: Relative Expression von COL5A1 nach multipler Stimulation mit BMP7

Tabelle 24: Relative Expression von DCN nach singulärer Stimulation mit BMP2

Tabelle 25: Relative Expression von DCN nach multipler Stimulation mit BMP2

Tabelle 26: Relative Expression von DCN nach singulärer Stimulation mit BMP7

Tabelle 27: Relative Expression von DCN nach multipler Stimulation mit BMP7

Tabelle 28: Relative Expression von FMOD nach singulärer Stimulation mit BMP2

Tabelle 29: Relative Expression von FMOD nach multipler Stimulation mit BMP2

Tabelle 30: Relative Expression von FMOD nach singulärer Stimulation mit BMP7

Tabelle 31: Relative Expression von FMOD nach multipler Stimulation mit BMP7

Tabelle 32: Relative Expression von MKX nach singulärer Stimulation mit BMP2

Tabelle 33: Relative Expression von MKX nach multipler Stimulation mit BMP2

Tabelle 34: Relative Expression von MKX nach singulärer Stimulation mit BMP7

Tabelle 35: Relative Expression von MKX nach multipler Stimulation mit BMP7

2. Einleitung

2.1. Rupturen des vorderen Kreuzbandes

2.1.1. Epidemiologie von Rupturen des vorderen Kreuzbandes

Verletzungen der Kreuzbänder gehören zu den häufigsten Sportverletzungen des Kniegelenks, und stehen je nach Literatur, Land und untersuchter Zielgruppe an zweiter bis vierte Stelle hinter Verletzungen der Menisken des Innenbandes oder Verletzungen der Patellasehne. (Abrams et al. 2012., Bollen S. 2000., Krajnc et al. 2010, Kuikka et al. 2013, Swenson et al. 2013.)

In der Literatur findet man Angaben über ca. 200 000 vordere Kreuzbandrupturen pro Jahr in den USA, von denen mehr als 100 000 operativ versorgt werden. (Brophy et al. 2009., Cimino F, Volk BS, Setter D. 2010., Griffin et al. 2006., Mall et al. 2014.)

Mall et al. beschreiben in ihrer Arbeit eine statistisch signifikante Zunahme der operativen Therapieverfahren von ca. 87 000 auf ca. 130 000, zwischen 1994 und 2006 in den USA. Dies ist einerseits mit einer insgesamt gestiegenen Inzidenz von vorderen Kreuzbandrupturen, andererseits mit einem gesteigerten gesellschaftlichen Anspruch hinsichtlich kurzer Rekonvaleszenz und Wiedererlangung einer maximal möglichen Funktionalität in Verbindung zu bringen. (Mall et al. 2014.)

Es finden sich in der Literatur Angaben über die Inzidenz dieser Verletzung von z.B. 60,9 pro 100 000 Personen pro Jahr in Finnland oder 79 pro 100 000 in Schweden. (Nordenvall et al. 2012., Parkkari et al. 2008.)

Besonders junge, sportlich aktive Personen sind häufig von Rupturen des vorderen Kreuzbandes betroffen. (Mall et al. 2014., Mather et al. 2013.)

Die geschlechtsspezifische Untersuchung epidemiologischer Daten lassen unterschiedliche Aussagen zu. Parkkari et al. und Nordenvall et al. beschreiben beide eine generell höhere Inzidenz unter Männern. (Nordenvall et al. 2012., Parkkari et al. 2008.)

In der Studie von Nordenvall et al. gibt es allerdings eine altersspezifische Ausnahme. In der Altersgruppe zwischen elf und 20 Jahren ist die Inzidenz bei Frauen höher. (Nordenvall et al. 2012.)

In Publikationen aus den USA zeigt sich ein erhöhtes Risiko für vordere Kreuzbandrupturen unter Frauen, wobei speziell Collegeathletinnen und Collegeathleten in unterschiedlichen Sportarten untersucht wurden. (Agel et al. 2005., Gwinn et al. 2000., Mihata et al. 2006.)

Mall et al. beschreiben eine signifikante Zunahme des Anteils von Frauen an allen am vorderen Kreuzband operierten Personen in den USA zwischen 1994 und 2006, wobei Männer nach wie vor den größeren Anteil an operierten Personen darstellen. (Mall et al. 2014.)

2.1.2. Anatomie des vorderen Kreuzbandes

Das vordere Kreuzband läuft von kranial, dorsolateral innerhalb der Gelenkkapsel nach kaudal, ventromedial. Der femorale Ansatz liegt dorsokranial an der medialen Fläche des lateralen Femurkondylus. Der tibiale Ansatz liegt in der Area intercondylaris anterior des Tibiaplateaus. Das hintere Kreuzband verläuft vom medialen Femurkondylus zur Area intercondylaris posterior des Tibiaplateaus. Ihrer Überkreuzung im Kniegelenk verdanken die Bänder ihren Namen. Das vordere Kreuzband besitzt einen kleineren Querschnitt als das Hintere. (Lobenhoffer P. 1999., Schünke M, Schulte E, Schumacher U. 2005, 2007., Witt M. 2007., Zantop et al. 2006.)

Während in älterer Literatur oft eine Unterteilung des vorderen Kreuzbandes in zwei Bündel, dem anteromedialen und dem posterolateralen Bündel beschrieben wird, findet man vor allem in neueren Arbeiten eine Teilung in drei Bündel. Dem anteromedialen, dem posterolateralen und dem intermediären Bündel. In präparierten Kniegelenken von Menschen, sowie diversen anderen Säugetieren fanden beispielsweise Tantisricharoenkul et al. drei verschiedene Orientierungen der Fasern des vorderen Kreuzbandes. Diese interpretierten sie als drei getrennte Bündel. (Tantisricharoenkul et al. 2013.)

Auch MacKay, Whitehead und Toms beschrieben 2014 den radiologischen Nachweis eines dritten Bündels mittels Magnetresonanztomographie. Dieses war aber nur bei ca. 20 Prozent der Probanden ihrer Studie nachweisbar. (MacKay JW, Whitehead H, Toms AP. 2014.)

Histologisch ist das vordere Kreuzband wie alle Bänder dem parallelfaserigen, straffen, kollagenen Bindegewebe zuzuordnen. Grundbestandteil dieses Gewebes sind Kollagenfasern, wenige elastische Fasern, Proteoglykane und in Reihen liegende, lang gestreckte Fibroblasten. Wie bei jedem Bindegewebe handelt es sich auch hierbei um ein zellarmes Gewebe. (Lüllmann-Rauch R. 2003, 2009.)

Ultrastruktur jeder Kollagenfaser sind in Bündeln parallel angeordnete Kollagenfibrillen. Diese bestehen hier aus Kollagenen der Typen I, III und V. (Amiel et al. 1984., Georgiev et al. 2019., Lüllmann-Rauch R. 2003, 2009.)

Die einzelnen Kollagenfasern werden von einer dünnen Schicht aus elastischem Bindegewebe umgeben, dem Endoligament. Mehrere dieser Fasern bilden einen Faserbündel, das wiederum von einer dickeren Bindegewebsschicht, dem Periligament, umgeben ist. Bänder bestehen aus mehrerer dieser Faserbündel die in ihrer Gesamtheit abermals von einer Bindegewebsschicht, dem Epiligament umschlossen sind. Da das vordere Kreuzband intraartikulär verläuft, ist es nach außen mit Synovialis überzogen. (De Rooster H, De Bruin T, Van Bree H. 2006, Haus J, Refior HJ. 1987.)

Die knöchernen Verankerungen des vorderen Kreuzbandes werden durch fibrokartilaginöse Entesen gebildet. (Georgiev et al. 2019.)

Als Entese bezeichnet man den natürlichen Übergang von Bändern oder Sehnen in Knochen. (Shaw HM, Benjamin M. 2007.)

Der histologische Aufbau einer solchen Entese wird in Kapitel 2.2. genauer beschrieben. (Vergleiche Kapitel 2.2.)

2.1.3. Ätiologie der Ruptur des vorderen Kreuzbandes

Sportarten, die mit einer hohen Rate an Rupturen des vorderen Kreuzbandes einhergehen, sind vor allem Mannschafts- und Ballsportarten wie Fußball, American Football, Basketball etc. sowie Skifahren. (Agel et al. 2005., Arastu MH, Grange S, Twyman R. 2015., Gwinn et al. 2000., Pujol N., Blanchi MPR, Chambat P. 2007., Svenson et al. 2013.)

Man kann grundsätzlich zwei Verletzungsmuster unterscheiden. Einerseits treten Rupturen mit Kontakt durch Dritte während des Verletzungsgeschehens auf, andererseits kommt es auch zu Rupturen ohne Fremdeinwirkung. Zweitgenanntes ist häufiger. (Agel et al. 2005., Hewett TE, Myer GD, Ford KR. 2006., Olsen et al. 2004.)

Typische Bewegungen die unter Belastung zu einer Ruptur führen können, sind vor allem Rotationsbewegungen im Kniegelenk bei fixiertem Unterschenkel. Des Weiteren werden Hyperextensionen des Kniegelenks bei entspannter ischiocruraler Muskulatur und extremer Varus- oder Valgusstress als Pathomechanismen beschrieben. (Hewett TE, Myer GD, Ford KR. 2006., Pujol N., Blanchi MPR, Chambat P. 2007.)

Olsen et al. haben anhand von Videoanalysen ein typisches Verletzungsmuster bei professionellen Handballerinnen identifiziert. Dabei befand sich das Knie in Hyperextension, Außen- oder Innenrotation und in Valgusstellung. (Olsen et al. 2004)

Ebenfalls durch Videoanalyse konnten Bere et al. die Kniebewegung während der Ruptur des vorderen Kreuzbandes bei professionellen Skiläufern beschreiben. Auch hier befand sich das Knie in Außen- bzw. Innenrotation und Valgusstellung, jedoch fand während des Verletzungsvorgangs eine Flexionsbewegung statt. (Bere et al. 2013.)

2.1.4. Symptomatik und Diagnostik der Ruptur des vorderen Kreuzbandes

Die typische Symptomatik bei vorderen Kreuzbandrissen umfasst eine Schwellung des Kniegelenks, Schmerzen und die daraus resultierenden Einschränkungen der Beweglichkeit. (Bollen S. 2000., Solomon et al. 2001.)

Ein deutlicher Hinweis auf eine Verletzung des Kapselbandapparates und auf eine Ruptur des vorderen Kreuzbandes, ist ein blutiger Erguss (Hämarthros) innerhalb der Kniegelenkshöhle nach passendem Trauma. (Arastu MH, Grange S, Twyman R. 2015., Jones JR, Allum RL. 1989., Solomon et al. 2001.)

Kann der Patient nach dem Trauma sein Kniegelenk wieder belasten, so kommt es meist zu einem Instabilitätsgefühl durch übermäßiges Vorwärtsgleiten der Tibia gegenüber dem Femur mit Rotationsinstabilität. Diese wird in der Literatur als Giving-way-Phänomen bezeichnet. Es tritt meist bei passiven Flexions- oder Rotationsbewegungen im Knie auf, wie z.B. von einer Stufe mit dem betroffenen Bein voran heruntersteigen oder schnelle Richtungswechsel vom betroffenen Bein weg. (Houck et al. 2003., Houck J, Yack HJ. 2001.)

Eine gründliche, klinische Untersuchung durch einen erfahrenen Untersucher und spezielle, richtig angewandte Untersuchungsmethoden wie der Lachman Test (Sensitivität von bis zu 100 Prozent) oder der Pivot-Shift Test (Sensitivität von bis zu 95 Prozent) sind äußerst effektiv, um Rupturen des vorderen Kreuzbandes zu diagnostizieren. (Navali et al. 2013., Solomon et al. 2001.)

Oftmals ist jedoch die Untersuchung des Knies posttraumatisch durch Schmerzen und Schwellung erschwert und weniger aussagekräftig. (Arastu MH, Grange S, Twyman R. 2015., Jones JR, Allum RL. 1989., Solomon et al. 2001.)

Bei der bildgebenden Diagnostik ist die konventionelle Röntgenuntersuchung des Kniegelenks in zwei Ebenen, mit tangentialer Patellazielaufnahme Methode der Wahl, um Frakturen bzw. knöcherne Ausrisse auszuschließen. Mit der Magnetresonanztomographie lässt sich das Kniegelenk, mit seinen knöchernen Strukturen und Weichteilen (Bänder, Muskeln, Gelenkkapsel etc.), sehr gut darstellen. Rupturen des vorderen Kreuzbandes können hiermit schnell und sicher diagnostiziert werden. (Arastu MH, Grange S, Twyman R. 2015., Crawford et al. 2007., Navali et al. 2013.)

2.1.5. Therapie der Ruptur des vorderen Kreuzbandes

Eine nicht bzw. zu spät diagnostizierte und inadäquat therapierte Ruptur des vorderen Kreuzbandes führt durch Instabilität und pathologische Scherbewegungen der Gelenkpartner, zu einer Schädigung der Menisken sowie des Gelenkknorpels und erhöht langfristig das Gonarthrosrisiko des betroffenen Gelenks. (Ageberg et al. 2007., Arastu MH, Grange S, Twyman R. 2015., Frobell et al. 2013., Frobell et al. 2010., Mather et al. 2013)

Es gibt sowohl die Möglichkeit der konservativen Therapie durch neuromuskuläre Rehabilitation mit Stärkung der Stütz Muskulatur sowie Reflex- und Koordinationstraining, als auch der operativen Kreuzbandersatzplastik mit anschließender Rehabilitation. Welches Verfahren angewendet wird ist von Fall zu Fall individuell zu prüfen, wobei die konservative Therapie eher älteren, inaktiven Patienten mit geringer Instabilität nach Kreuzbandruptur empfohlen wird. (Ageberg et al. 2007., Mather et al. 2013.)

Frobell et al. konnten 2010 sowie 2013 in randomisierten, kontrollierten Studien mit einem Follow-Up von zwei bzw. fünf Jahren keine Unterschiede zwischen einer frühen operativen Versorgung der Kreuzbandruptur mit anschließender Rehabilitation und der primären Rehabilitation mit der Option einer späteren operativen Versorgung ausmachen. Ihre Patientengruppe umfasste junge Patienten zwischen 18 und 35 Jahren mit hohem Aktivitätsniveau. Die Gruppen wurden mit Hilfe des Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score (KOOS) verglichen. Dies ist ein Fragebogen, der bei Knieverletzungen die zu einer Gonarthrose führen können angewendet wird. (Frobell et al. 2013., Frobell et al. 2010.)

Mather et al. konnten für die USA eine Kostenreduktion sowohl der kurzfristigen Therapiekosten, als auch der langfristigen gesellschaftlichen Kosten sowie einen Gewinn an qualitätskorrigierten Lebensjahren bei früher, operativer Therapie der vorderen Kreuzbandruptur gegenüber der alleinigen Rehabilitation nachweisen. (Mather et al. 2013.)

Nach den aktuellen Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie e.V. von 2018 sollte nur dann ein konservativer Therapieversuch durchgeführt

werden, wenn eine geringe Instabilität besteht, kein Instabilitätsgefühl vorliegt, es sich um Patienten im fortgeschrittenen Lebensalter mit ggf. arthrotischen Gelenksveränderungen handelt, ein geringes Aktivitätsniveau bzw. ein absehbar geringes Aktivitätsniveau vorliegt und keine Ambitionen bestehen dieses zu steigern. Andernfalls wird die Empfehlung zur operativen Kreuzbandersatzplastik ausgesprochen. Hierbei ist das arthroskopische Vorgehen die Methode der Wahl. (Herbort M, Lobenhoffer P. 2018)

Die arthroskopische Kreuzbandersatzplastik kann als einfacher Bündelersatz oder Doppelbündelersatz durchgeführt werden. Als Ersatzsehne bzw. Transplantat wird standardmäßig die autologe Semitendinosussehne, Grazilissehne oder ein Teil des autologen Ligamentum patellae (Autografts) verwendet. Bei Rupturen werden die autologe Quadrizepssehne sowie die Plantarissehne (Autografts) oder allogene Transplantate von Spenderleichen (Allografts) verwendet. Im Falle von Begleitverletzungen, die eine zusätzliche Knieinstabilität hervorrufen, konnte eine Überlegenheit der Doppelbündeltechnik im Tiermodell, sowie an Menschen nachgewiesen werden. Bei der isolierten Ruptur des vorderen Kreuzbandes beim Menschen konnte jedoch keine statistisch signifikant überlegene Operationsmethode ermittelt werden. (Eichhorn HJ, Birkner W. 2006., Desai et al. 2013., Johnson et al. 1996., Murawski et al. 2013., Nikolaou et al. 2009., Tiamklang et al. 2012., Zhu et al. 2012.)

2.1.6. Versagen von vorderen Kreuzbandersatzplastiken

Crawford et al. haben in einer Metaanalyse von 2013 eine generelle Versagensrate der vorderen Kreuzbandersatzplastiken, unabhängig der Ursache von 11,6 Prozent errechnet. (Crawford et al. 2013.)

Johnson und Coen haben in ihrer Publikation von 1995 die sogenannte Pittsburgh Klassifikation etabliert, die die häufigsten Ursachen für das Versagen von vorderen Kreuzbandplastiken in drei Gruppen unterteilt. Versagen der

Kreuzbandplastik aufgrund fehlerhafter Operationstechnik, insuffizientem Einwachsen und erneuter Traumata. (Johnson DL, Coen MJ. 1995)

Die prozentuale Häufigkeit der Ursachen für das Versagen von Kreuzbandplastiken wurde 2010 von Wright et al. genauer untersucht und beschrieben. In dieser Forschungsarbeit lag das Versagen aufgrund von Traumata bei 32 Prozent, das aufgrund von fehlerhafter Technik bei 24 Prozent und das aufgrund von mangelndem Einwachsen bzw. biologischem Versagen bei 7 Prozent. Bei 37 Prozent lag eine Kombination von mindestens zwei dieser Faktoren vor. Bei 19 Prozent eine Kombination aus biologischem Versagen und mindestens einer weiteren Ursache. (Wright et al. 2010.)

Je nach Platzierung der Bohrkanäle sowie des Kreuzbandersatzes kommt es postoperativ zu einer unterschiedlichen Verteilung der Kräfte im Gelenk und auf das Transplantat. (van Eck et al. 2011., Mae et al. 2001., Yamamoto et al. 2004.)

Eine fehlerhafte Platzierung hat einen starken Einfluss auf die Stabilität und stellt somit ein potentiellies Risiko für ein Versagen der Kreuzbandplastik dar. (Ménétrety et al. 2008., Yagi et al. 2002.)

Technische Fehler sind also ein fehlerhaftes Setzen der Bohrlöcher, somit eine inkorrekte Lage der Kreuzbandplastik, eine mangelnde oder übermäßige Spannung des Transplantats sowie eine inadäquate Fixierung. (Ménétrety et al. 2008.)

Mehrere Studien und Metaanalysen konnten einen signifikanten Vorteil von autologen Transplantaten (Autografts) gegenüber allogenen Transplantaten (Allografts) bezüglich der Versagensrate bei Kreuzbandplastiken zeigen. (Kaeding et al. 2011., Kraeutler MJ, Bravman JT, McCarty EC. 2013., Yao et al. 2014.)

Ein traumatisch bedingtes Versagen der Kreuzbandplastik tritt meist innerhalb eines kurzen Zeitraums nach der primären Operation auf und ist auf ein zu aggressives physiotherapeutisches Trainingsprogramm oder eine zu schnelle Rückkehr zu sportlichen Aktivitäten zurück zu führen. (Getelman MH, Friedman MJ. 1999., Ménétrety et al. 2008.)

Biologisches Versagen kann als Ausschlussdiagnose gestellt werden, wenn es keine Hinweise auf eine traumatische Ursache gibt oder kein technischer Fehler beim Einbringen der Plastik aufgetreten ist. Die Pathophysiologie hierfür ist nicht komplett verstanden. Meist ist diese aber auf überschießende Nekrosen des Sehnenersatzes, mangelhafte Vaskularisation, ungenügende zelluläre Proliferation und Repopulation sowie fehlende Umbauprozesse, die normalerweise die histologische Umwandlung der Ersatzsehne hin zu einer bandähnlichen Struktur (Ligamentation) mit Einwachsen in den Knochen bewirken, oder eine Kombination aus den genannten Faktoren zurückzuführen. (Ménétrety et al. 2008., Samitier et al. 2015.)

Kommt es zum Versagen einer vorderen Kreuzbandersatzplastik sind in 7 Prozent der Fälle mangelhaftes Einwachsen bzw. andere, biologische Komplikationen im Heilungsprozess und in 19 Prozent eine Kombination aus biologischem Versagen mit mindestens einer weiteren Ursache verantwortlich. Auf Grund der hohen Prävalenz der vorderen Kreuzbandruptur und einer generellen Versagensrate von 11,6 Prozent aller vorderen Kreuzbandersatzplastiken, bestehen hier weitreichende individuelle und gesundheitsökonomischen Konsequenzen. Dies untermauert die Notwendigkeit weiterführender Forschung hinsichtlich Ursachen und Möglichkeiten zur Prävention des biologischen Transplantatversagens.

2.2. Transplantateinheilung und Knochen-Sehneninteraktion

Nach dem Einbringen einer vorderen Kreuzbandersatzplastik durchläuft ein allogenes Sehnenransplantat vier Stadien bis man von einer Einheilung spricht. Zuerst kommt es während einer akuten Entzündungsreaktion zu einer Nekrose innerhalb der eingebrachten Sehne. Während der folgenden chronischen Entzündungsreaktion führt die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren wie dem Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), dem Fibroblast Growth Factor 2 (FGF-2) und Stickstoffmonoxid (NO) aufgrund der hypoxischen Umgebung, zur Vaskularisation des Transplantats. Anschließend kommt es zur Zellproliferation

bzw. Repopulation und letztendlich zur Ligamentation. (Deehan DJ, Cawston TE. 2005., Ménétrey et al. 2008., Samitier et al. 2015.)

Die Ligamentation ist ein komplizierter Prozess und beschreibt die histologischen Veränderungen, welche das aus einer Sehne gewonnene Transplantat durchläuft, um letztendlich einen ähnlichen Aufbau wie das ursprüngliche Band anzunehmen. Im Vergleich zu Sehnen, findet man in Bändern mehr Kollagen Typ III. Generell ist der Kollagenanteil in Sehnen wesentlich höher als in Bändern. Es handelt sich hierbei hauptsächlich um Kollagen Typ I. Bänder enthalten mehr Glykosaminoglykane. In Bändern sind außerdem der Anteil an kollagenen Quervernetzungen, der DNA-Gehalt und die metabolische Aktivität erhöht.

Nach Einbringen einer Sehne als Kreuzbandplastik zeigt sich ein Umbau dieser. Der Anteil an Kollagen Typ III, die kollagenen Quervernetzungen und der Anteil an Glykosaminoglykanen nehmen zu, während der gesamte Kollagenanteil abnimmt. (Amiel et al. 1984., Amiel et al. 1986, Marumo et al. 2005)

Auch beim Einwachsen des Sehnentransplantates in den Bohrkanal kommt es zu histologischen Veränderungen. Primär kommt es zur Bildung eines fibrinösen, zellreichen Gewebes, mit neugebildeten Gefäßen. Sogenanntem Granulationsgewebe zwischen Sehne und Knochen. Während des gesamten Prozesses sind um die Sehne Entzündungszellen zu finden. Nach und nach kommt es zur Kallusbildung durch das Einwachsen von Geflechtknochen und zur Proliferation von Chondrozyten in dem Spalt zwischen Sehne und Knochen. Im weiteren Verlauf bilden sich Kollagenfasern aus, die vom Knochen in die Sehne und umgekehrt einwachsen. Man spricht nun von einer kartilaginösen Intermediärzone. Die Chondrozyten beginnen dann die Extrazellulärmatrix zu kalzifizieren. Über diesen Prozess der enchondralen Ossifikation kommt es letztendlich zur Ausbildung von lamellarem Knochen, der das Sehnentransplantat verankert. (Hibino et al. 2007., Hjorthaug et al. 2015., Rodeo et al. 1993.)

Diese neugebildeten Knochen-Sehnenverankerungen sind jedoch biomechanisch minderwertig im Vergleich zu nativen Knochen-Sehnen- bzw. Knochen-Bänderverankerungen. Der natürliche Übergang von Sehnen oder

Bändern in den Knochen wird Enthese genannt. Wichtig für die Stabilität dieser ist der histologische Aufbau. Innerhalb dieser fibrokartilaginösen Enthese lassen sich folgende vier verschiedenen Zonen unterscheiden:

1. das Band bzw. die Sehne aus Fibroblasten und Kollagen
2. nicht mineralisierte Faserknorpel mit in Reihen stehenden Fibrochondrozyten
3. mineralisierter Faserknorpel mit hypertrophen Fibrochondrozyten
4. Knochen bestehend aus Knochenmatrix, Osteozyten, Osteoblasten und Osteoklasten

(Benjamin et al. 2002., Shaw HM, Benjamin M. 2007.)

Während in der Extrazellulärmatrix der 2. Zone hauptsächlich Kollagen Typ I und Typ II zu finden sind, ist in der 3. Zone Kollagen Typ V das dominierende Kollagen. (Niyibizi et al. 1996., Petersen W, Tillmann B. 1999., Wang et al. 2007.)

Bei einwachsenden Sehnentransplantaten eine biomechanische Stabilität, ähnlich der der natürlichen Enthese zu erreichen, ist seit längerem Gegenstand der Forschung. Viele Enzyme, Zytokine, Hormone, Wachstumsfaktoren und Signalkaskaden sind an der Reifung und Entstehung der natürlichen Entesen beteiligt. Auch die Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) 2 und 7 sollen bei diesen Prozessen eine Rolle spielen. Inwieweit diese genutzt werden können, um Knochen-Sehnen-Integrationsprozesse zu optimieren und welche molekularbiologischen Prozesse durch sie angestoßen bzw. beeinflusst werden, ist Gegenstand vieler Arbeiten und soll auch in dieser bezüglich des Expressionsverhaltens sehnenpezifischer Proteine genauer betrachtet werden. Bisherige Arbeiten konnten beispielsweise eine vermehrte mechanische Belastbarkeit der Verankerung und ein beschleunigtes Einwachsen von Sehnentransplantaten in den Knochen nach BMP2 oder 7 Stimulation nachweisen. (Eliasson P, Fahlgren A, Aspenberg P. 2008., Hashimoto et al. 2007., Mihelic et al. 2004., Zhang L, Jin AM, Li Q. 2008.)

2.3. Bone Morphogenetic Proteins (BMPs)

2.3.1. Historie und Übersicht

Die Wirkung von BMPs wurde erstmals 1965 von Marshall R. Urist erwähnt, als er eine osteoinduktive Potenz von homologen, demineralisierten Knochen auf Muskulatur und frakturierten, vitalen Knochen im Kaninchenmodell beschrieb. (Urist MR. 1965.)

Man vermutete Proteine in Form von Wachstumsfaktoren hinter diesem Effekt, konnte die ursächlichen Mitglieder der BMP Familie jedoch erst in den frühen 1980ern aus Rattenknochen extrahieren. In den späten 1980ern bis heute konnten diese mit Hilfe der Sequenzierung von Aminosäureabfolgen sowie der Gensequenzierung identifiziert und klassifiziert werden. Die BMPs wurden mit Ausnahme von BMP1, welches eine Metalloprotease darstellt, den Wachstumsfaktoren der Transforming Growth Factor β (TGF- β) Familie zugeordnet. Mittlerweile wurden über 20 Mitglieder der BMP-Familie identifiziert. (Cao X, Chen D. 2005., Carreira et al. 2014.a, Chen D, Zhao M, Mundy GR. 2004., Luyten et al. 1989., Wozney JM. 1992., Wozney et al. 1988., Sampath TK, Reddi AH. 1981.)

Neben einer osteoinduktiven bzw. osteoproliferativen Wirkung auf Knochen, Knorpel, Sehnen, Bänder und Muskulatur, wirken die verschiedenen BMP-Subtypen auch auf andere Gewebe und haben dort weitere Effekte. So wurden auch chondro- und tenoproliferative Effekte, mesodermale und neurodermale Induktion sowie Migration, Angiogenese und Einflüsse auf die Oogenese bzw. Follikelreifung postuliert. (Carreira et al. 2014.a, Chen D, Zhao M, Mundy GR. 2004., Oryan et al. 2014.)

Tabelle 1 fasst einige BMP Subtypen, ihre Funktion und ihre Gen- oder Proteinexpression in Gewebe und Organen kurz zusammen.

Tabelle 1: Übersicht über die BMP-Familie (adaptiert übernommen aus Carreira et al. 2014.a)

BMP Subtyp	Synonyme	Funktion	Genexpression	Proteinexpression	Genlokus
BMP2	BMP2A, BDA2	Knochen- und Knorpelformierung	Darm, Niere, Larynx, Bindegewebe, Milz, Prostata, Amnionflüssigkeit, Auge, Herz, Ganglien, Cervix, Plazenta, Lunge, Pankreas, Gehirn, Magen, Leber, Knochen, Uterus, Hoden, Brustdrüse	Lunge, Milz, Kolon, Herz, Gehirn, Plazenta, Leber, Skelettmuskulatur, Niere, Pankreas, Prostata, Ovar, Dünndarm	20p12
BMP3A	Osteogenin, BMP3	Senkt die Knochendichte; Antagonisiert den osteoinduktiven Effekt vieler anderer BMPs	Knochen, Auge, Darm Lunge, Pharynx, Muskulatur embryonales Gewebe, Prostata, Blut	Knorpel	4q21
BMP3B	GDF10	Regulation von Wachstum und Differenzierung in embryonalen und adultem Gewebe	Hoden, Gehirn, Ohr, Lungen, Auge, embryonales Gewebe, Prostata, Bindegewebe, Hypophyse, Larynx, Herz	Femur, Gehirn, Lunge, Skelettmuskel, Pankreas, Hoden	10q11.22
BMP4	BMP2B, MCOPS6, OFC11, ZYME	Knochen- und Knorpelformierung; Mesodermale Entwicklung; Zahnbildung; Entwicklung der Extremitäten, Frakturheilung; Inhibiert Haarwachstum	Darm, embryonales Gewebe, Plazenta, Leber, Magen, Gehirn, Knochen, Prostata, Gefäße, undifferenziertes Gewebe, Hoden, Mundhöhle, Brustdrüse, Lunge, Pankreas, Ovar, Herz, Haut, Bindegewebe, Lymphgewebe, Fettgewebe, Speicheldrüsen, Niere	Lunge, Nieren, Prostata (normal, neoplastisch benigne sowie maligne)	14q22–q23
BMP5		Knochen- und Knorpelformierung	Plazenta, Herz, Thymus, Uterus, Hoden, Bindegewebe, Ovar, Brustdrüse, embryonales Gewebe, Lunge, Pankreas, Leber, Gehirn, Muskulatur, Trachea, Prostata, Auge, Darm	Lunge, Leber	6p12.1
BMP6	VGR, VGR-1	Knochen- und Knorpelformierung	Gefäße, Auge, embryonales Gewebe, Darm, Blut, Plazenta, Gehirn, Ovar, Lunge, Prostata, Uterus, Hoden, Larynx, Zervix, Niere, Brustdrüse, Bindegewebe, Mundhöhle, Nebenschilddrüse		6p24–p23
BMP7	OP-1	Knochen- und Knorpelformierung; Vermutlich ein osteoinduktiver Faktor der für die epitheliale Osteogenese verantwortlich ist; Spielt eine Rolle in der Kalziumregulation sowie in der Knochenhomöostase	Gehirn, Plazenta, Auge, Hoden, Niere, Prostata, Muskulatur, Herz, embryonales Gewebe, Darm, Brustdrüse, Magen, Ovar, Mundhöhle, Thymus, Trachea, Bindegewebe, Uterus, Haut, Tonsillen, Lymphgewebe	Niere, Blase, Gehirn	20q13
BMP8A	OP-2	Knochen- und Knorpelformierung; Vermutlich ein osteoinduktiver Faktor der für die epitheliale Osteogenese verantwortlich ist; Spielt eine Rolle in der Kalziumregulation sowie in der Knochenhomöostase	Haut, Schilddrüse, Brustdrüse, Gehirn, Hoden, Darm, Thymus, Larynx, Plazenta, Bindegewebe, Knochen, Milz, embryonales Gewebe, Magen		1p34.3
BMP8B	BMP8	Knochen- und Knorpelformierung; Vermutlich ein osteoinduktiver Faktor der für die epitheliale Osteogenese verantwortlich ist; Spielt eine Rolle in der Kalziumregulation sowie in der Knochenhomöostase	Haut, Hoden, Leber, Gehirn, Darm, Pankreas, Muskulatur, Uterus, Ovar, Knochen, Knochenmark, Rückenmark, Auge, embryonales Gewebe, Ganglien, Prostata		1p35–p32
BMP9	GDF2	Inhibitor der Angiogenese; Vermutlich an Knochenformierung beteiligt	Leber		10q11.22
BMP10		Erhält die proliferative Aktivität von embryonalen Kardiomyozyten durch Aufrechterhaltung der Expressionslevel von speziellen kardiogenen Faktoren, wie MEF2C und NKX2-5; Inhibiert die Migration und das Wachstum von Endothelzellen	Ascites		2p13.3
BMP11	GDF11	Spielt eine wichtige Rolle während der embryonalen Entwicklung für die Differenzierung von mesodermalen und neuralen Gewebe sowie für die Skelettentwicklung	Auge, Gehirn, Haut, Brustdrüse, Mundhöhle, Darm, Lunge, Uterus, Amnionflüssigkeit, Muskulatur, Blut, Hoden, Leber, Pankreas, Tonsillen, Niere, Plazenta, Prostata, Bindegewebe, Nebenschilddrüse, Nerven, Knochen, embryonales Gewebe, Thymus, Herz, Nabelschnur, Nebenniere, Lymphgewebe		12q13.2
BMP12	GDF7	Spielt vermutlich eine wichtige Rolle im Motorcortex	Niere, Gehirn, Hoden,		2p24.1
BMP13	GDF6, CDPM2, MCOP4	Knochen- und Gelenkformierung in den Extremitäten, Schädelknochen und axialen Skelett; Wichtige Rolle bei der Bildung von Grenzen zwischen den einzelnen Elementen des Skelettsystems während der Entwicklung	Embryonales Gewebe, Hoden, Knochen, Gehirn, Plazenta		8q22.1
BMP14	GDF5, CDPM1, LAP4, OS5, SYNS2	Vermutlich an der Knorpel- und Knochenformierung beteiligt	Auge, embryonales Gewebe, Lunge, Herz, Knochen, Hypophyse, Gehirn, Speicheldrüsen, Bindegewebe, Prostata, Haut, Uterus	Während der Embryonalentwicklung in den langen Röhrenknochen	20q11.2
BMP15	GDF9B, ODG2, POF4	Vermutlich an der Follikelreifung beteiligt; Oozyten spezifischer Wachstums- und Differenzierungsfaktor		Ovar	Xp11.2
BMP16	Nodal	Essentiell für die Mesodermformierung und das axiale Wachstum während der Embryonalentwicklung	Embryonales Gewebe, Hoden		10q22.1
BMP17	Lefty1, LeftyB	Wird für die axiale Links-Rechts-Festlegung benötigt	Embryonales Gewebe, Gelenke, Gehirn, Brustdrüse, Lymphgewebe, Milz, Pankreas, Hoden, Hamblase, Darm, Lunge, Leber, Haut		1q42.1
BMP18	Lefty2, LeftyA	Wird für die asymmetrische Links-Rechts-Festlegung der Organe benötigt; Spielt eine Rolle bei endometrialen Blutungen	Embryonales Gewebe, Hoden, Gehirn		1q42.1+A14 A13:F20A12: F20A11:F20 A10:A15:F20

2.3.2. Molekularstruktur und Signalwege der BMPs

BMPs sind Glykoproteine mit einem niedrigen Molekulargewicht, die aus zwei Untereinheiten bestehen und entweder als Homo- oder Heterodimere vorkommen. Die reifen Proteine bestehen aus ca. 100 bis 140 Aminosäuren mit sieben konservierten Cystinresten, von denen sechs die intramolekulare und einer die intermolekulare, dimere Struktur über die Bildung von Disulfidbrücken stabilisieren. Weitere Stabilität verschaffen N- oder O-glykosylierte Bereiche innerhalb der Molekularstruktur, welche die Halbwertszeit im Körper erhöhen. (Bragdon et al. 2001., Carreira et al. 2014.a, Carreira et al. 2014.b, Oryan et al. 2014., Shi et al. 2013.)

Anhand ihrer Aminosäuresequenz können die BMPs in vier Untergruppen eingeteilt werden. Die Einteilung ist Tabelle 2 zu entnehmen.

Tabelle 2: Untergruppen innerhalb der BMP-Familie

Gruppe A	Gruppe B	Gruppe C	Gruppe D
BMP2, 4	BMP5, 6, 7, 8A, 8B	BMP9, 10	BMP12, 13, 14

Innerhalb der Zellen wird primär ein Precursor-Protein synthetisiert, aus dem durch einen zellulären Reifungsprozess die BMPs entstehen. Das Precursor-Protein besteht aus 400 bis 500 Aminosäuren. Am N-Terminus trägt es ein hydrophobes Signalpeptid, welches das Protein in den zellulären Sekretionsweg einschleust. Des Weiteren enthält es eine Prodomäne, die essentiell für die regelrechte Faltung ist. Das reife BMP wird schließlich von einer Subtilisin-gleichen Konvertase aus dem C-terminalen Ende heraus gespalten. (Bragdon et al. 2001., Carreira et al. 2014.a, Carreira et al. 2014.b, Oryan et al. 2014.)

Die BMPs binden wie alle Vertreter der TGF- β Familie an Serin- bzw. Threonin-Kinase Rezeptoren, die in zwei Gruppen unterteilt werden. Die erste sind die BMP Typ I, die zweite die BMP Typ II Rezeptoren.

Drei wichtige Vertreter der ersten Gruppe sind der BMP Typ IA Rezeptor (BMP-IA) auch Acivin Receptor-like Kinase 3 (ALK-3) genannt, der BMP Typ IB

Rezeptor (BMP-IB) auch Activin Receptor-like Kinase 6 (ALK-6) genannt und die Activin Receptor-like Kinase 2 (ALK-2).

Die drei wichtigsten Vertreter der BMP Typ II Rezeptoren sind der BMP Typ II Rezeptor (BMP-II), der Activin Typ II Rezeptor (ActR-II) und der Activin Typ IIB Rezeptor (ActR-IIB). (Miyazono K, Maeda S, Imamura T. 2005., Tsumaki N, Yoshikawa H. 2005., Wan M, Cao X. 2004.)

Jeweils zwei BMP Typ I und zwei BMP Typ II Rezeptoren bilden sowohl präformiert, als auch nach vorangegangener Bindung eines Liganden, einen transmembranösen, homo- oder heterotetrameren Rezeptorkomplex. Die BMP Typ II Rezeptoren sind dauerhaft, die Typ I Rezeptoren erst nach Ligandenbindung und die dadurch eingeleitete Komplexbildung mit Typ II Rezeptoren phosphoryliert. BMPs binden also entweder an präformierte Rezeptorkomplexe oder an BMP Typ I Rezeptoren, die dann BMP Typ II Rezeptoren zur Komplexbildung rekrutieren. Diverse BMPs binden in unterschiedlichem Gewebe an Zellen mit BMP Typ I Rezeptoren. An BMP Typ II Rezeptoren binden vornehmlich BMP2, 4, 6 und 7, die für die Osteo- und Chondrogenese eine wichtige Rolle spielen. (Cao X, Chen D. 2005., Carreira et al. 2014.a, Carreira et al. 2014.b, Miyazono K, Maeda S, Imamura T. 2005., Tsumaki N, Yoshikawa H. 2005., Wan M, Cao X. 2004.)

Je nachdem ob ein BMP an einen präformierten Typ I bzw. Typ II Rezeptorkomplex bindet oder mit Bindung eine Komplexbildung initiiert, werden unterschiedliche intrazelluläre Signalkaskaden in Gang gesetzt.

Bindet ein BMP einen präformierten Komplex, aktiviert der Typ II Rezeptor durch Phosphorylierung den Typ I Rezeptor, der wiederum eine Smad regulierte Signalkaskade initiiert. Initial werden Rezeptor-Smads (R-Smads) aktiviert. Zu diesen zählen Smad1, 5 und 8. Zusammen mit Smad4, einem Co-Smad, bilden sie einen heteromeren Komplex, der in den Nucleolus transduziert und die Expression diverser Gene reguliert. Zu diesen zählen zum Beispiel der Runt-related Transkriptionsfaktor 2 (Runx2) und Osterix (Osx), die für die Osteoblastendifferenzierung und den Knochenmetabolismus eine wichtige Rolle spielen. Intrazelluläre Regulatoren und Inhibitoren dieses Signalweges sind die Inhibitor-Smads (I-Smads) Smad6, 7, 8b sowie Smurf1 und 2. (Carreira et al.

2014.a, Carreira et al. 2014.b, Miyazono K, Maeda S, Imamura T. 2005., Oryan et al. 2014., Tsumaki N, Yoshikawa H. 2005., Wan M, Cao X. 2004.)

Wird eine Rezeptorkomplex-Bildung durch BMP Bindung erst initiiert, so wird intrazellulär der Mitogen-aktiviertes Protein (MAP) Kinase Signalweg in Gang gesetzt. Hierbei handelt es sich um sich nacheinander aktivierende Proteinkinasen. Die Aktivierung erfolgt jeweils durch Phosphorylierung. Nach Ligandenbindung an den Rezeptor kommt es zur Aktivierung des Ras-Proteins. Dieses aktiviert zunächst eine MAP Kinase Kinase Kinase (MAPKKK), in diesem Fall das Raf-Protein. Dieses aktiviert eine MAP Kinase Kinase (MAPKK) wie hier MEK1 bzw. MEK2. Diese aktivieren wiederum eine MAP Kinase (MAPK), in diesem Fall ERK1 bzw. ERK2. Diese nehmen auf die Expression diverser Gene Einfluss. Darunter auch Runx2, das wiederum zu einer Stimulation der Smad-regulierten Signalkaskade führt. (Carreira et al. 2014.a, Carreira et al. 2014.b, Miyazono K, Maeda S, Imamura T. 2005., Tsumaki N, Yoshikawa H. 2005., Wan M, Cao X. 2004.)

Extrazelluläre Inhibitoren und Regulatoren der BMPs sind zum Beispiel Chordin, Noggin, Follistatin und Ventroptin. (Carreira et al. 2014.b, Oryan et al. 2014., Wan M, Cao X. 2004.)

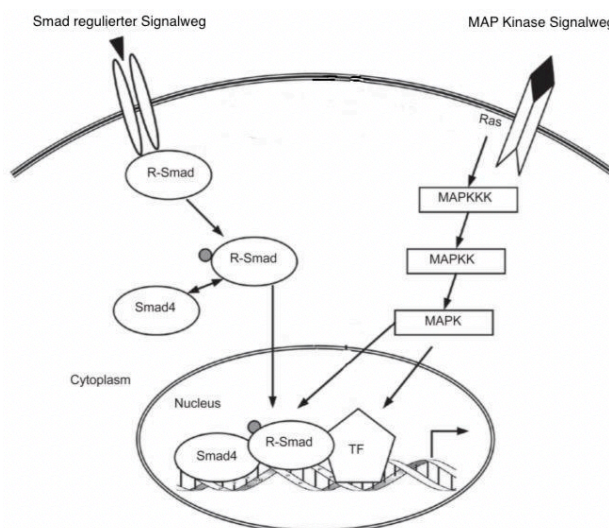


Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung intrazellulärer Signalwege nach BMP Rezeptoraktivierung (adaptiert übernommen aus Guo X, Wang XF. 2009.)

2.3.3. BMP2

BMP2 (Synonyme: BMP2A, BDA2) ist ein niedermolekulares Glykoprotein, dessen Genlokus sich auf dem kurzen Arm von Chromosom 22 befindet (22p12). Es bindet an der Zielzelle einen BMP Typ II Rezeptor, der einen Typ I Rezeptor aktiviert und mit diesem gemeinsam eine intrazelluläre Smad Signalkaskade in Gang setzt, die zur Expression von Runx2 und Osx führt. (Vergleiche Kapitel 2.3.2.) (Carreira et al. 2014.a, Mandal et al. 2016., Oryan et al. 2014., Rosen V. 2009.)

Es wird in diversen Organen und Geweben exprimiert und hat diverse Wirkungen bzw. Funktionen. (Vergleiche Kapitel 2.3.1.) Es induziert und steigert beispielsweise Knochen- und Knorpelwachstum sowie deren Formierung. Speziell für die enchondrale Ossifikation spielt es während des Skelettwachstums eine wichtige Rolle, aber auch für den Erhalt des adulten Skeletts und die Knochenregeneration. (Carreira et al. 2014.a, Oryan et al. 2014., Poon et al. 2016., Rosen V. 2009.)

Klinisch wurde und wird rekombinant hergestelltes BMP2 deshalb bereits im Bereich der Orthopädie, Unfallchirurgie sowie der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie erprobt und angewendet. So wird es beispielsweise in xenogenen Cages bei Spondylodesen aufgrund schwerer Bandscheibendegeneration eingebracht oder in Kollagenschwämmchen als Alternative zu allogenen oder autologen Knochenspänen. Auch zu Kieferknochenrekonstruktionen, der Verankerung von dentalen Implantaten und Gelenkknorpelregeneration unter Einsatz von BMP2 findet man Arbeiten. Es werden auch Nebenwirkungen im Einsatz beschrieben wie beispielsweise die zirkumskripte heterotrophe Ossifikation, Herz-Kreislaufkomplikationen, Blindheit, neurologische Auffälligkeiten oder Wundinfektionen. Auch kanzerogene Eigenschaften wurden dem BMP2 zugeschrieben. 2008 veröffentlichte die Food and Drug Administration (FDA) für die USA eine Gesundheitswarnung, dass es bei dem Einsatz von BMP2 in zervikalen Spondylodesen zu lebensbedrohlichen Schwellungen im Bereich des Nackens mit Kompression der Luftwege kommen kann. Die Evidenz bezüglich der Vor-

und Nachteile des Einsatzes von BMP2 im Vergleich zu den konventionellen Operationsmethoden ist bisher noch nicht eindeutig, sodass auch hier abzuwarten bleibt, welche Ergebnisse zukünftige Arbeiten hervorbringen. (Fu et al. 2013., Geiger M, Li RH, Friess W. 2003., Gomes-Ferreira et al. 2016., Khan SN, Lane JM. 2004., Poon et al. 2016.)

Tierstudien zeigten, dass sich BMP2 positiv auf die Knochen-Sehnenintegration auswirkt. Der Einheilungsprozess von Sehneninterponaten im knöchernen Bohrtunnel wurde durch das Einbringen von BMP2 entweder als Lösung in die Sehne oder mittels eines löslichen Kollagenschwamms in den Tunnel beschleunigt. Die Knochen-Sehnenverwachsung zeigte anschließend ein mechanisch stabileres Ergebnis im Vergleich zu unbehandelten Knochen-Sehnenverwachsungen. Die durch BMP2 stimulierte Knochen-Sehnenintegrationszone zeigte eine vergleichbare Histologie zur natürlichen Entthese. (Vergleiche Kapitel 3.2). (Hashimoto et al. 2007., Rodeo et al. 1999.)

Im Tiermodell konnten Chen et al. bei Kaninchen ein verbessertes Einwachsen der Infraspinatussehne in den Humerus bei Rekonstruktionen der Rotatorenmanschette nachweisen. (Chen et al. 2011.)

In einer weiteren Arbeit konnten Chen et al. eine Zunahme der Knochenformierung und der mechanischen Stabilität der Knochen-Sehnenintegrationszone nach Kreuzbandrekonstruktion mit Semitendinosussehnenentransplantaten bei Kaninchen, durch Zugabe von BMP2 stimulierten, aus dem Knochenmark gewonnenen Stammzellen in den Knochentunnel nachweisen. (Chen et al. 2016.)

2.3.4. BMP7

BMP7 (Synonym: OP-1) ist ein niedermolekulares, homodimeres Glykoprotein, dessen Genlokus sich auf dem langen Arm von Chromosom 22 befindet (20q13). Es wird in diversen Organen und Geweben exprimiert, wie beispielsweise Knochen, Knorpel, Niere, Prostata oder Brustdrüse. Nach BMP Typ I und II Rezeptorbindung aktiviert es intrazellulär ebenfalls eine Smad

Signalkaskade. (Vergleiche Kapitel 2.3.2.) (Boon et al. 2011., Buijs et al. 2007., Carreira et al. 2014.a, Oryan et al. 2014., Saini et al. 2014.)

BMP7 spielt eine wichtige Rolle für die Skelettentwicklung, die Knochen- und Knorpelbildung sowie deren Homöostase, in der embryonalen Entwicklung der Nieren und in der Regulation der Adipogenese bzw. des Energiehaushaltes. (Carreira et al. 2014.a, Chubinskaya S, Hurtig M, Rueger DC. 2007., Mihelic et al. 2004., Oryan et al. 2014., Ozeki et al. 2013., Patel SR, Dressler GR. 2005., Saini et al. 2014.)

Des Weiteren wird eine Rolle bei der Entstehung bestimmter Malignome und der Knochenmetastasierung dieser vermutet. So zeigt BMP7 beispielsweise eine gesteigerte Expression in entarteten Zellen von Brustdrüse und Prostata. (Buijs et al. 2007., Ye L, Bokobza SM, Jiang WG. 2009., Ye et al. 2007.)

In der reifen Niere konnte eine antiinflammatorische bzw. antifibrotische Wirkung von BMP7 im Tiermodell gezeigt werden. Es hemmt die Ausschüttung von Tumor Nekrose Faktor α (TNF- α) induzierten Interleukinen und Cytokinen sowie die durch TGF- β induzierte kollagene Fibrosierung. Potentiell könnte es somit ein zukünftiger Therapieansatz bei chronischen Nierenerkrankungen, insbesondere zur Prävention einer renalen Fibrose sein. (Boon et al. 2011., Patel SR, Dressler GR. 2005.)

Aufgrund seiner osteoinduktiven Potenz wurde BMP7 in verschiedenen Trägermedien als therapeutische Alternative zum autologen Knochenspan, bei Pseudarthrosebildung nach Frakturen, bei Frakturheilungsstörungen sowie bei Spondylodesen sowohl in Tiermodellen, als auch am Menschen untersucht. Während es in Tiermodellen einen Vorteil gegenüber der herkömmlichen Therapie zeigte, sind die Ergebnisse der Studien mit Menschen sehr unterschiedlich und eine klare Evidenz besteht nicht. In Europa ist die Therapie mit BMP7 nur bei Frakturheilungsstörungen langer Röhrenknochen indiziert, wenn eine autologe Knochentransplantation nicht möglich ist und andere Verfahren gescheitert sind. (Boon et al. 2011., White et al. 2007.)

Auch die Rolle von BMP7 als wichtiger Wachstumsfaktor in der Knorpelhomöostase wurde für den klinischen Einsatz genauer untersucht. So konnte in in-vitro Modellen sowie in in-vivo Tiermodellen ein regenerativer Effekt

von BMP7 auf geschädigten Gelenkknorpel und Bandscheiben gezeigt werden. Dies könnte man sich bei der Therapie der Arthrose zu Nutze machen. Zurzeit finden klinische Studien in diesem Bereich statt. (Boon et al. 2011., Chubinskaya S, Hurtig M, Rueger DC. 2007.)

Ozeki et al. konnten an Ratten nachweisen, dass BMP7 in der Lage ist eine faserknorpelige Differenzierung in Sehnenzellen auszulösen, indem sie mit BMP7 behandelte Stücke von Achillessehnen als Meniskusersatz bei großen Meniskusdefekten verwendeten. (Ozeki et al. 2013.)

Mihelic et al. Zeigten, dass BMP7 bei Schafen das Einheilen von Transplantatsehnen bei vorderen Kreuzbandersatzplastiken verbessert. In ihrem Modell wurde die Sehne des Musculus peroneus als Transplantat verwendet, da die Grazilissehne und die Semitendinosussehne bei Schafen zu kurz ist. (Mihelic et al. 2004.)

Die proliferative Wirkung von BMP7 auf Knochen und Sehnenzellen, die Fähigkeit die Differenzierung dieser zu beeinträchtigen sowie die Ergebnisse der Arbeit von Mihelic et al. weisen auf das Potential von BMP7 hin, die Knochen-Sehnenintegration bzw. das Einwachsen von Sehnen in Knochen zu stimulieren.

2.4. Kollagene

2.4.1. Übersicht

Bei Kollagenen handelt es sich um Proteine der extrazellulären Matrix. Sie können bei Säugetieren bis zu einem Drittel des Gewichtes aller Proteine des Körpers ausmachen. Es wurden bisher 27 verschiedenen Typen von Kollagen beschrieben. Kollagen Typ I zählt wie Kollagen Typ II, III, V, XI, XXIV und XXVII zu den Fibrillen bildenden Kollagenen. Dies beschreibt ihre Fähigkeit, Kollagenfibrillen durch Zusammenlagerung von einzelnen homologen Molekülen als Superstruktur auszubilden. Diese sind über kovalente Bindungen, sogenannte Crosslinks, untereinander stabilisiert. Fibrillen bildende Kollagene

besitzen als Superstruktur eine Trippelhelix aus drei Aminosäureketten bzw. Polypeptiden. Sie sind nach ihrer Proteinstruktur und der genomischen Organisation ihrer Gene in drei Gruppen unterteilt. Zur Gruppe A gehören die Kollagene I, II, III und die Alpha 2 Kette von Kollagen V. Zur Gruppe B werden Kollagen XI, V Alpha 1 und 3 gezählt. Gruppe C wird durch die Kollagene XXIV und XXVII gebildet. (Kwansa AL, De Vita R, Freeman JW. 2014., Lüllmann-Rauch. 2003, 2009., Mitchel et al. 2012.)

2.4.2. Kollagen Typ I Alpha I (COL1A1)

Kollagen I zählt zu den Fibrillen bildenden Kollagenen. Es ist das vorherrschende Kollagen der Extrazellulärmatrix in Säugetieren und somit in diversen Bindegeweben zu finden. Neben Knochen, Kornea und Haut ist es überwiegend in Sehnen und Bändern vorhanden, wo es durch spezielle Fibroblasten, sogenannte Ligamentozyten und Tendinozyten synthetisiert wird. Es ist essentiell für den Aufbau und die mechanische Stabilität dieser Gewebe. (Kwansa AL, De Vita R, Freeman JW. 2014., Lüllmann-Rauch. 2003, 2009., Stamov et al. 2015.)

Das Kollagen Typ I Molekül setzt sich aus zwei COL1A1 Aminosäurenketten und einer COL1A2 Kette in Form einer Trippelhelix zusammen. (Vergleiche Kapitel 2.4.3.)

Bei den N- und C-terminalen Bereichen innerhalb des Moleküls, handelt es sich um sogenannte Telo peptide, also nicht-gewundene Anteile. (Kurt-Sirin et al. 2014., Kwansa AL, De Vita R, Freeman JW. 2014., Pan et al. 2013., Stamov et al. 2015.)

Für COL1A1 kodiert das COL1A1-Gen. Der Genloкус befindet sich auf dem langen Arm von Chromosom 17 (17q 21.31-22.15). (Egle Benušienė E, Kučinskas V. 2000., Dalglish Raymond. 1997., Gensure et al. 2016., Jin et al. 2016.)

Mutationen im Bereich dieses Gens sind an der Pathogenese bestimmter Formen des Ehlers-Danlos-Syndroms, der Osteogenesis Imperfecta und des

Caffey-Syndroms (Infantile Kortikale Hyperostose) beteiligt. (Cabral et al. 2005., Gensure et al. 2016., Hoyer-Kuhn H, Netzer C, Semler O. 2015., Rowe et al. 1985., Shi et al. 2015., Starman et al. 1989.)

Der Polymorphismus eines einzelnen Nukleotids innerhalb dieses Gens beeinträchtigt die Bindung des Transkriptionsfaktors SP1 und führt zu einer Überexpression von COL1A1. Es entsteht ein Ungleichgewicht von COL1A1 und COL1A2, welches zu einer gestörten Kollagenstruktur führt und einen Risikofaktor für die Entstehung von Osteoporose darstellt. (Vergleiche Kapitel 2.4.3.) (Dytfeld et al. 2016., Grant et al. 1996., Kurt-Sirin et al. 2014.)

Hayashi et al. konnten eine Herunterregulierung der Expression von COL1A1 in hepatozellulären Karzinomen (HCC) durch Promotermethylierung nachweisen und schrieben der COL1A1 Expression eine potentielle Funktion als Prognosefaktor beim HCC bezüglich des Überlebens zu. (Hayashi et al. 2014.)

2.4.3. Kollagen Typ I Alpha II (COL1A2)

Das COL1A2 ist wie COL1A1 ein Polypeptid, das als Untereinheit des Kollagen Typ I Moleküls fungiert und wird für die Synthese im Verhältnis 1:2 im Vergleich zu COL1A1 benötigt. (Vergleiche Kapitel 2.4.2.)

Wie COL1A1 ist es ein Hauptanteil der Extrazellulärmatrix von Bindegewebe und besonders in Sehnen und Bändern für die mechanische Stabilität verantwortlich. Auch in Haut, Knochen und Kornea wird es exprimiert. (De Wet et al. 1987., Kwansa AL, De Vita R, Freeman JW. 2014., Lüllmann-Rauch. 2003, 2009., Stamov et al. 2015.)

Für COL1A2 kodiert das COL1A2-Gen, das sich auf dem langen Arm von Chromosom 7 befindet (7q21.3–q22.1).

(Egle Benušienė E, Kučinskas V. 2000., Dalglish Raymond. 1997.)

Mutationen im COL1A2-Gen werden ebenfalls als potentielle Ursache bei Formen der Osteogenesis Imperfecta beschrieben. (Trummer et al. 2001., Wenstrup et al. 1991.)

In einzelnen Fällen wurden Mutationen im COL1A2-Gen auch bei Patienten mit Ehlers-Danlos-Syndrom und Marfan-Syndrom nachgewiesen und als an der Pathogenese beteiligt beschrieben. (Byers et al. 1981., Hatamochi et al. 2014., Weil et al. 1990.)

2.4.4. Kollagen Typ V Alpha I (COL5A1)

Kollagen V ist ein kleineres, Fibrillen bildendes Kollagen der Extrazellulärmatrix und besitzt ebenfalls eine Trippelhelix als Superstruktur. Es sind jedoch drei Formen dieser bekannt. Am häufigsten ist eine Trippelhelix bestehend aus zwei COL5A1 Aminosäurenketten und einer Kollagen Typ V Alpha II (COL5A2) Kette. Es gibt jedoch eine homotrimere Helix aus drei COL5A1 Ketten sowie ein heterotrimere aus jeweils einer COL5A1, COL5A2 und einer Kollagen Typ V Alpha III (COL5A3) Kette. (Altinisik et al. 2015., Burger M, De Wet H, Collins M. 2015., Mitchel et al. 2012.)

Das COL5A1-Gen befindet sich auf dem langen Arm von Chromosom 9 (9q34.2-34.3). Das COL5A1 Polypeptid ist für die Formierung und die Zusammenlagerung von Kollagenfibrillen essentiell. Es interagiert mit und stabilisiert Kollagen Typ I Fibrillen in vielen Geweben, speziell in Sehnen und Bändern. Es ist somit ebenfalls für deren mechanische Stabilität verantwortlich. (Abrahams et al. 2013., Altinisik et al. 2015., Burger M, De Wet H, Collins M. 2015., Lüllmann-Rauch. 2003, 2009., Mitchel et al. 2012.)

Mutationen im COL5A1-Gen bzw. Störungen der Synthese von COL5A1 spielen in der Pathogenese der klassischen Form des Ehlers-Danlos-Syndroms, sowie bei gewissen Formen mit schwerer Gefäßbeteiligung eine entscheidende Rolle. (Monroe et al. 2015., Ritelli et al. 2013., Sun et al. 2015.)

Des Weiteren findet man in der Literatur Arbeiten, die einen Zusammenhang zwischen Sequenzvarianten und Polymorphismen innerhalb des COL5A1-Gens und Erkrankungen des tendinösen Halte- und Stützapparats, wie der Epicondylitis humeri radialis, der chronischen Achillessehnentendinopathie und

dem Carpal-tunnelsyndrom beschreiben. (Abrahams et al. 2013., Altinisik et al. 2015., Burger M, De Wet H, Collins M. 2015.)

2.5. Decorin (DCN)

DCN (Synonyme: Proteoglycan II/ PGII) ist ein von Fibroblasten gebildetes Mitglied der Familie der kleinen Proteoglycane und Bestandteil der Extrazellulärmatrix von Bindegeweben. Es kommt besonders in Geweben wie Sehnen und Bänder mit viel Kollagen Typ I vor, an das es bindet und an der Bildung, Organisation und der Stabilisierung von Kollagenfibrillen beteiligt ist. (Gordon et al. 2015., Hildebrand et al. 1994., Järveläinen H, Sainio A, Wight TN. 2015., Merline et al. 2015., Schönherr et al. 1998.)

Das für DCN kodierende DCN-Gen befindet sich auf dem kurzen Arm von Chromosom 12 (12p12.1). (McBride OW, Fisher LW, Young MF. 1990.)

Hauptbestandteil und essentiell für die Funktion des DCN ist ein Kernprotein, welches durch Leucin-reiche Tandemrepeats gebildet wird und von Cystin Gruppen an den Enden flankiert ist, die Disulfidbrücken ausbilden. Das Kernprotein besteht aus 24 Aminosäuren. (Feugaing DDS, Götte M, Viola M. 2013., Järveläinen H, Sainio A, Wight TN. 2015., Schönherr et al. 1998.)

DCN spielt aber nicht nur als Protein der extrazellulären Matrix eine Rolle für die Stabilität von Bindegewebe, sondern interagiert mit diversen Wachstumsfaktoren und Zytokinen. So inhibiert es beispielsweise die Wirkung des TGF- β , des Platelet Derived Growth Factor (PDGF), des Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und der Angiopoetine (ANG). Darüber hinaus erhöht es die Konzentration von Interleukin-10 (IL-10) in entzündetem Gewebe und moduliert bzw. reguliert die Wirkung von Epithelial Growth Factor Receptor (EGFR) sowie Connective Tissue Growth Factor (CTGF). DCN wird ein hemmender Einfluss auf Entzündungen, Angiogenese, Proliferation sowie Migration und Metastasierung von Tumorzellen zugeschrieben. (Feugaing DDS, Götte M, Viola M. 2013., Hildebrand et al. 1994., Järveläinen H, Sainio A, Wight TN. 2015., Merline et al. 2015., Schönherr et al. 1998.)

So geht beispielweise eine hohe DCN Expression in nicht kleinzelligen Lungenkarzinomen, Multiplen Myelomen oder Kolonkarzinomen mit einer verbesserten Prognose durch geringeres Überleben, verminderte Zellteilungsraten und Metastasierung der Tumorzellen einher. (Shi et al. 2015., Nemani et al. 2014., Nyman et al. 2015.)

Auch in gutartigen Tumoren wie Keloiden scheint sich eine niedrige Expression von DCN negativ auf den Verlauf auszuwirken. In-vitro Versuche mit DCN exprimierenden Adenoviren als Vektoren konnten nach Expressionssteigerung von DCN in Keloiden eine Abnahme der übermäßigen Kollagen Typ I und III Expression, welche einen Hauptbestandteil der Pathogenese darstellt zeigen. (Lee et al. 2015., Meenakshi et al. 2009.)

2.6. Fibromodulin (FMOD)

Bei FMOD handelt es sich ebenfalls um ein kleines, interstitielles Proteoglycan der Extrazellulärmatrix. Wie DCN besitzt es ein Kernprotein aus Leucin-reichen Tandemrepeats die von Cystin-haltigen Enden flankiert sind. (Vergleiche Kapitel 2.5.)

Es kommt besonders in hyalinem Gelenkknorpel, Sehnen, Bändern und der Sklera vor, wo es von Chondrozyten und Fibroblasten exprimiert wird. Während der fetalen Knochenentwicklung wird es ebenfalls von Osteoblasten gebildet. (Antonsson P, Heinegård D, Oldberg A. 1993., Gori F, Schipani E, Demay MB. 2001., Kalamajski S, Oldberg A. 2007., Roughley et al. 1996.)

Für FMOD kodiert das FMOD-Gen, das sich auf dem langen Arm von Chromosom 1 befindet (1q32). (Sztrolovics et al. 1994.)

FMOD bindet in Binde- und Stützgeweben an die Kollagene Typ I, II und XII. Es reguliert die Bildung, das Wachstum sowie den Aufbau von Kollagenfibrillen und die Zusammensetzung der Extrazellulärmatrix. Für die Kollagenbindung spielt auch beim FMOD das Kernprotein eine entscheidende Rolle. (Antonsson P,

Heinegård D, Oldberg A. 1993., Gori F, Schipani E, Demay MB. 2001., Roughley et al. 1996.)

FMOD hat wie DCN eine hemmende Wirkung auf TGF- β und spielt beispielsweise eine Rolle in kartilaginären Entzündungsprozessen und in der Wundheilung. (Vergleiche Kapitel 2.5.) (Kalamajski S, Oldberg A. 2007., Mayr et al. 2016., Zheng et al. 2014.a, Zheng et al. 2014.b)

Auf die Angiogenese hat FMOD einen fördernden Einfluss, indem es die Expression von Angiopoetin-2 und Vertretern der VEGF-Familie steigert. (Zheng et al. 2014.a, Jian et al. 2013.)

FMOD wird in den entarteten Zellen der Chronisch Lymphatischen Leukämie (CLL) und anderen B-Zell Lymphomen, wie dem Mantelzelllymphom überexprimiert, und als tumorspezifisches Antigen beschrieben. (Mayr et al. 2016., Mikaelsson et al. 2016.)

Mondal et al. haben epigenetisch alteriertes FMOD, das TGF- β Signalwege moduliert, als potentiellen Verursacher von Tumorzellentstehung und Migration beim Glioblastoma multiforme beschrieben. Dies könnte einen neuen Therapieansatz darstellen. (Mondal et al. 2016.)

2.7. Mohawk Homebox Transkriptionsfaktor (MKX)

MKX (Synonyme: Iroquois-related homebox like 1/ Irx11) ist ein Transkriptionsfaktor, der zur Familie der Three Amino-Acid Loops Extension Überklasse der atypischen Homebox Gene gehört. Die Genprodukte dieser Gene sind Transkriptionsfaktoren, welche die Expression anderer funktionell zusammenhängender Gene während der Morphogenese regulieren. (Anderson et al. 2006., Anderson et al. 2012., Ito et al. 2010., Liu et al. 2010., Hupfeld M. 2017.)

Wichtig für die Funktion des MKX ist eine Homöodomaine innerhalb des Proteins, die aus ca. 60 Aminosäuren besteht, welche drei α -Helix Konfigurationen ausbilden. Die Homöodomaine ist entscheidend für die

Interaktion mit der DNA in der Zielzelle. (Anderson et al. 2006., Anderson et al. 2012.)

MKX ist einer der Hauptregulatoren der Skelettmuskel- und Sehnenentwicklung. Er wird besonders während der körperlichen Entwicklung und Organogenese in Sehnen, Skelettmuskeln, Knochen und Knorpel aber auch dem männlichen Keimstrang und dem metanephrogenem Blastem exprimiert. (Anderson et al. 2012., Ito et al. 2010., Liu et al. 2010., Onizuka et al. 2014.)

Ito et al. konnten zeigen, dass Mäuse bei denen das MKX-Gen deaktiviert wurde, unter starken Sehnenhypoplasien leiden und die Expression von Proteoglycanen der Extrazellulärmatrix wie z.B. DCN und Typ I Kollagen stark reduziert wird. (Ito et al. 2010.)

Liu et al. konnten vergleichbare Ergebnisse nachweisen und zeigten, dass auch FMOD bei Mäusen mit deaktiviertem MKX-Gen in den Sehnen vermindert exprimiert wird. (Liu et al. 2010.)

Otabe et al. konnten eine tenogene Differenzierung, von aus dem Knochenmark gewonnenen humanen Stammzellen, durch MKX nachweisen. So steigerten mit adenoviralen Vektoren behandelten Stammzellen beispielsweise die Expression von COL1A1. (Otabe et al. 2015.)

2.8. Fragestellung und Ziele dieser Arbeit

In vorangegangenen Forschungsprojekten wurden Zelllinien muriner Preosteoblasten (MC3T3-E1) sowie Fibroblasten (3T6 oder 3T3) in einer Ko-Kultur angezüchtet. Dieses Modell wurde genutzt, um das Wachstums- und Expressionsverhalten der Zelllinien nach Stimulation mit diversen Wachstumsfaktoren oder Wirkstoffen zu untersuchen. So wurde unter anderem die Wirkung von BMP2, BMP7, selektiver Cyclooxygenase-2-Hemmer und nicht selektiver Cyclooxygenase-Hemmer auf die oben genannten Zelllinien beschrieben. Im Fokus des Interesses lagen neben dem makroskopischen und mikroskopischen Wachstumsverhalten, auch die Expression von knochen- bzw.

sehnenspezifischen Genen und Regulatorproteinen der BMP Signalkaskade. (Schwarming et al. 2015., Schwarming et al. 2015., Schwarming et al. 2016.)

Bei dem verwendeten Ko-Kulturmodell wurde sich an einem von Wang et al. entwickelten Modell orientiert. (Wang et al. 2007.)

Ziel dieser Arbeit war es die Wirkung von BMP2 und BMP7 auf die Expression sehnenspezifischer Gene durch murine Preosteoblasten (MC3T3-E1) sowie Fibroblasten (3T6 oder 3T3) in diesem Ko-Kulturmodell zu untersuchen. Neben der Expression in den genannten Zellreihen stand auch die Expression in einer sogenannten Intermediärzone im Fokus des Interesses. Diese beschreibt den Bereich zwischen den Zellreihen, der zunächst durch einen Agarosesteg getrennt war. (Vergleiche 3.2.1.)

In den vorangegangenen Forschungsprojekten war lichtmikroskopisch ein Einwachsen von beiden Zellreihen in diesen Bereich, nach Entfernung des Agarosestegs zu beobachten. (Schwarming et al. 2015., Schwarming et al. 2016.)

Neben Unterschieden in der Wirkung auf die Expression sehnenspezifischer Gene zwischen den beiden Wachstumsfaktoren, sollten auch stimulations-, zeit- und dosisabhängige Effekte untersucht werden. So war die Expressionsänderung nach einmaliger (singulärer) und mehrfacher (multipler) Stimulation mit einem der Wachstumsfaktoren sowie Änderungen im zeitlichen Verlauf Teil der Fragestellung.

3. Material und Methodik

3.1. Materialien

3.1.1. Einmalprodukte

Pipettenspitzen:

- Star Lab 10 µl Graduated Tip; Cat. No.: S1111-3000 (Star Lab, Hamburg, Deutschland)
- Star Lab 100 µl Bevelled, Filter Tip; Cat. No.: S1120-1840 (Star Lab, Hamburg, Deutschland)
- Star Lab 200 µl Graduated, Filter Tip; Cat. No.: S1120-8810 (Star Lab, Hamburg, Deutschland)
- Star Lab 1000 µl Blue, Graduated Tip; Cat. No.: S1111-2021 (Star Lab, Hamburg, Deutschland)

Reaktionsgefäße zur cDNA Synthese und Verdünnung:

- Eppendorf Polypropylene PCR Tube 0,2 ml; Order No.: 0030 124.332; Cat. No.: 951010006 (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

Reaktionsgefäße zur Verdünnung und Aufbewahrung der Primer:

- Sarstedt Mikro tube with cap 2 ml; No./REF: 72.694 (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)

Reaktionsgefäße zum Ansetzen des Mastermix:

- Sarstedt SafeSeal Micro Tubes 1,5 ml; No./REF: 72.706 (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
- Sarstedt SafeSeal Micro Tubes 2,0 ml; No./REF: 72.695.500 (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)

Real-Time PCR Platten und Folien:

- VWR low profile flat 96 PCR plate with printed labels 0,2 ml; VWR European Cat. No.: 211-0276 (VWR, Radnor, USA)
- Peqlab low profile 96 well PCR plate; Cat. No.: 82-0700-A (Peqlab, Erlangen, Deutschland)
- Sarstedt, Adhäsive PCR Folie, stark klebend; No./REF: 95.1993 (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)

3.1.2. Chemikalien

Real-Time PCR:

- H₂O destilliert, autoklaviert und filtriert durch BioPak Filter (Merck Millipore, Billerica, USA)
- Bio Rad SsoFast Eva Green Super Mix; Cat. No.: 172-5204 (Bio Rad, Hercules, USA)

cDNA Synthese:

- Nuclease free Water
- Bio Rad 5x iScript Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR; Cat. No.: 170-8841 (Bio Rad, Hercules, USA)

Primer:

QuantiTect Primer Assay (Qiagen, Venlo, Niederlande):

- Mm_Col1a1_1_SG; Cat. No.: QT00162204; Lot No.: 117376938 (+TE Puffer pH8)

Sigma-Aldrich (St. Louis, USA):

- mActb for2 RT; Batch No.: ST01222047; Oligo No.: 8014066077-000190
- mActb rev2 RT; Batch No.: ST01222048; Oligo No.: 8014066077-000200
- mHprt for2 RT; Batch No.: ST01222049; Oligo No.: 8014066077-000210
- mHprt rev2 RT; Batch No.: ST01222050; Oligo No.: 8014066077-000220

- mScx for2 RT; Batch No.: ST00890328; Oligo No.: 8012316625-000090
- mScx rev2 RT; Batch No.: ST00890329; Oligo No.: 8012316625-000100
- mCol1A2 for2 RT; Batch No.: ST00933186; Oligo No.: 8012540784-000150
- mCol1A2 rev2 RT; Batch No.: ST00933187; Oligo No.: 8012540784-000160
- mFmod for2 RT; Batch No.: ST01494774; Oligo No.: 8015494603-000030
- mFmod rev2 RT; Batch No.: ST01494775; Oligo No.: 8015494603-000040
- mDcn for RT; Batch No.: ST01494780; Oligo No.: 8015494603-000090
- mDcn rev RT; Batch No.: ST01494781; Oligo No.: 8015494603-000100
- mCol5A1 for RT; Batch No.: ST01503163; Oligo No.: 8015539088-000010
- mCol5A1 rev RT; Batch No.: ST01503164; Oligo No.: 8015539088-000020
- mMkx for RT; Batch No.: ST01503165; Oligo No.: 8015539088-000030
- mMkx rev RT; Batch No.: ST01503166; Oligo No.: 8015539088-000040

3.1.3. Geräte

Tabelle 3: Verwendete Geräte

Name	Herstellername	Hersteller
Autoklav	3850EL	Tuttnauer, Breda, Puerto Rico
Gefrierschrank	Premium Line	Liebherr, Bulle, Schweiz
PCR Detection System	CFX96 Real-Time PCR Detection System	BioRad, Hercules, USA
Pipetten	Research Pipette 0,1-2,5 µl Research Pipette 1-10µl Research Pipette 2-20µl Research Pipette 20-200µl Research Pipette 100-1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Thermal Cycler	FlexCycler	Anylytik Jena, Jena, Deutschland
Zentrifugen	Biofuge 13 Centrifuge 5430R Sprout	Heraeus, Hanau, Deutschland Eppendorf, Hamburg, Deutschland Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Vortex	Reagenzglasmixer Vortex	neoLab Migge, Heidelberg, Deutschland

3.2. Methodik

3.2.1. Ko-Kultur und mRNA-Gewinnung in den Vorgängerprojekten

In den vorangegangenen Forschungsprojekten (Schwarting et al. 2015., Schwarting et al. 2015.) wurden Zelllinien muriner Präosteoblasten (MC3T3-E1) sowie Fibroblasten (3T6 oder 3T3), bezogen von der Firma DSMZ (Braunschweig, Deutschland), in einer Ko-Kultur mit den Wachstumsfaktoren BMP2 und 7 singulär und multipel so stimuliert, dass es zu einer Interaktion in einer sogenannten Intermediärzone kam. Für die mit BMP2 stimulierten Ko-Kulturen wurden 3T6 und MC3T3-E1 Zellen, für die mit BMP7 stimulierten Ko-Kulturen 3T3 und MC3T3-E1 Zellen verwendet. Bei dem verwendeten Ko-Kulturmodell wurde sich an einem von Wang et al. entwickelten und bereits erprobten Modell orientiert. (Wang et al. 2007.)

Die MC3T3-E1 Zellen wurden primär in einem Minimal Essential Medium, Eagle α Modifikation (α MEM) und die 3T6 bzw. 3T3 Zellen in Dulbecco's Modified Essential Medium (DMEM) bei 37°C mit befeuchteter Luft und einem CO₂ Anteil von 5 Prozent inkubiert. Beide Medien wurden mit 10 Prozent Kalbserum, 100U/l Penicillin und 100µg/ml Streptomycin versetzt. Für die Ko-Kultur wurden Zelllinien aus den Passagen 6 bis 7 der kultivierten MC3T3-E1 Zellen und den Passagen 8 bis 9 der kultivierten 3T6 bzw. 3T3 Zellen verwendet. Um Nebeneffekte durch die verschiedenen Kulturmedien zu minimieren, wurden die MC3T3-E1 Zellen zehn Tage vor der Aussaat in die Ko-Kultur ebenfalls in DMEM überführt.

Bevor die Zellen ausgesät wurden, wurden die verwendeten Gewebeschalen mittels eines 1,2cm breiten Agarosestegs in zwei Zonen unterteilt. Zur Herstellung des Agarosestegs wurde Zellkultur erprobte Agarose (Bio Rad, Hercules, USA) erhitzt und flüssig in 100*20mm Zellkulturschalen gegossen. Nach dem Abkühlen und Aushärten der Agarose, wurden die Stege von Hand mittels Einmalskalpellen (Braun, Melsungen, Deutschland) ausgeschnitten, in neue Zellkulturschalen überführt und dort mittels erhitzter, flüssiger Agarose am

Boden befestigt. Die unterschiedlichen Zelllinien wurden jeweils in einer Zone ausgesät und ihnen wurden jeweils zehn Minuten Zeit gegeben, um am Boden anzuwachsen. Das Verhältnis von MC3T3-E1 zu 3T6 bzw. 3T3 Zellen betrug 2:1. Die Platten wurden dann mit DMEM versetzt mit 1mM Glycerol-2-phosphat und 10µg/ml Ascorbinsäure aufgefüllt, bis der Agarosesteg komplett von Medium bedeckt war. Die Schalen wurden anschließend zwei Tage inkubiert (37°C, befeuchtete Luft bei 5 Prozent CO₂) bevor der Agarosesteg entnommen wurde.

Nun wurden die Kulturen nach verschiedenen Stimulationsschemata weiter mit den Wachstumsfaktoren BMP2 (Pfizer, New York, USA) oder BMP7 (Stryker, Duisburg, Deutschland), einmalig (singulär) oder mehrfach (multipel) stimuliert und inkubiert (37°C, befeuchtete Luft bei 5 Prozent CO₂). Für jedes Stimulationsschema wurden zwölf Kulturen angelegt. Drei wurden jeweils nicht, drei mit 100ng/ml, drei mit 250ng/ml und drei mit 500ng/ml BMP2 oder 7 beimpft. Dies geschah bei den singulären Stimulationsschemata einmalig unmittelbar nach Entnahme des Agarosestegs, bei den multiplen zusätzlich an den Tagen 3 und 7 nach Stegentnahme. An den Tagen 3 und 7 wurde ebenfalls das Medium erneuert. Die nicht stimulierten Proben dienten als Kontrollgruppe. Die verschiedenen Stimulationsschemata wurden Läufe genannt und mit Buchstaben versehen. Buchstabe und Stimulationsart sind Tabelle 4 zu entnehmen.

Tabelle 4: Stimulationsschemata der einzelnen Läufe

	Singuläre Stimulation	Multiple Stimulation
BMP 7	Lauf A	Lauf B
BMP 2	Lauf E	Lauf F

Täglich wurden das Wachstum und die Expansion in der Intermediärzone, dem Bereich in dem sich der Agarosesteg befunden hatte, lichtmikroskopisch mittels umgekehrten Phasenkontrasts untersucht. An den Tagen 3, 7 und 10 nach Stegentnahme wurden jeweils eine Kulturschale ohne, eine mit 100ng/ml, eine mit 250ng/ml und eine mit 500ng/ml BMP-Stimulation aus dem Versuch

genommen. Es wurde das Medium entfernt und die Kulturschalen anschließend mit kalter Phosphat-gepufferten Salzlösung (PBS-Puffer) gewaschen.

Zur Zellablösung und Zellyse wurde eine Kulturschale schräg gehalten und entlang der oberen Grenze einer Zone, bei den mit BMP2 stimulierten Kulturen vorsichtig 600µl RLT Puffer (RNeasy Kit, Qiagen, Hilden, Germany), bei den mit BMP7 stimulierten Kulturen 600µl RA1 Lysis Puffer (NucleoSpin RNA Isolation Kit, Macherey-Nagel, Düren, Germany) hinzu pipettiert. Die lysierten Zellen wurden mittels Zellkratzer vom Boden gelöst und in Reaktionsröhrchen überführt. Diese wurden bei -80°C zwischengelagert. Der Vorgang wurde in jeder Zone einer Platte wiederholt, sodass man zonenspezifisch Proben erhielt. Nach Beendigung eines Versuchsdurchlaufes wurde mRNA mittels NucleoSpin RNA Mini Extraction Kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) aus den tiefgefrorenen Lösungen isoliert und mRNA-haltige Proben gewonnen. (Schwarting et al. 2015.)

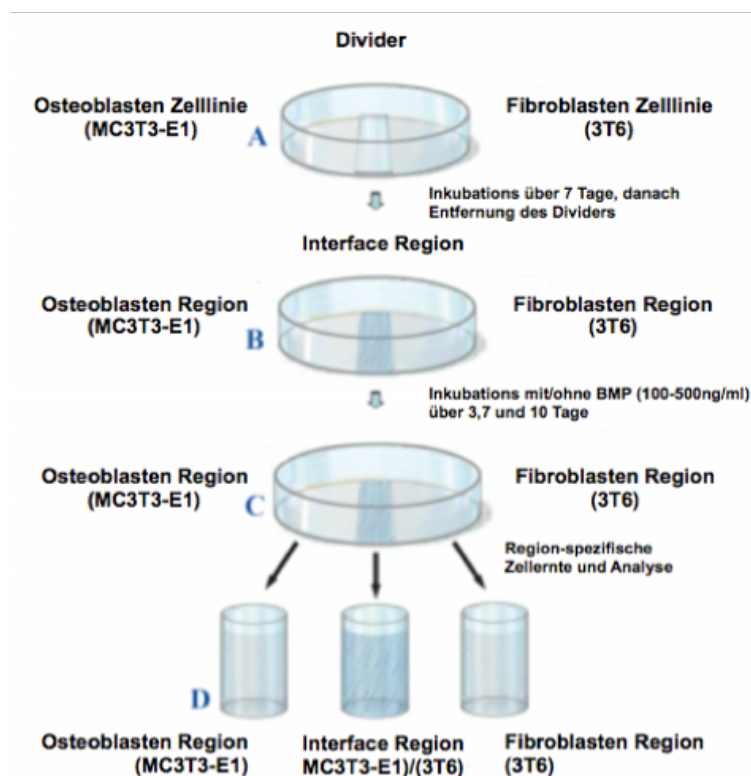


Abbildung 2: Graphische Darstellung des Ablaufs der Ko-Kultivierung (aus Schwarting et al. 2015.)

Im Anschluss an die Extraktion der mRNA erfolgte die Konzentrationsbestimmung der gewonnenen Proben. Dies geschah mittels photometrischer Quantifizierung durch einen Spectrophotometer (NanoDrop 1000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Durch das Gerät wurde die Absorption von ultraviolettem Licht (UV-Licht) mit einer Wellenlänge von 260nm in einer Probe gemessen und daraus die optische Dichte berechnet. Mit dem Spectrophotometer konnte man auch die Verunreinigung der Proben mit Peptiden, Proteinen und Polysacchariden bestimmen. Aromatische Aminosäuren weisen beispielsweise bei 280nm ihr Absorptionsmaximum auf. Es wurde also die Absorption von UV-Licht mit einer Wellenlänge von 280nm in einer Probe gemessen und ein Quotient aus der Absorption bei 260nm Wellenlänge (A_{260}) sowie der bei 280nm Wellenlänge (A_{280}) derselben Probe gebildet. Ergibt der Quotient A_{260}/A_{280} einen Wert größer zwei, ist die Probe nicht signifikante durch Proteine verunreinigt. Nach dem gleichen Prinzip wurde auch die Absorption von UV-Licht mit 230nm Wellenlänge (A_{230}) gemessen und erneut ein Quotient mit der Absorption bei 260nm Wellenlänge (A_{260}) gebildet. Ein Quotient A_{260}/A_{230} größer zwei sprach hier gegen eine signifikante Verunreinigung durch Polysaccharide und Proteine.

Um eine statistische Auswertung mit Berechnung von Mittelwerten und Standardabweichungen zu ermöglichen, wurden für jeden Lauf drei Versuchsdurchführungen durchgeführt. Die mRNA enthaltenden Proben wurden durchnummeriert. Es gibt also jeweils drei Proben, die mit der gleichen Konzentration an BMP2 oder 7 singular bzw. multipel stimuliert worden sind und die im gleichen Bereich einer Kulturplatte, zum gleichen Zeitpunkt nach Agarosestegentnahme in einer der drei Versuchsdurchführungen entnommen wurden. Diese drei Proben bilden zusammen ein sogenanntes biologisches Set. Die Zuordnung der Proben zu den biologischen Sets ergibt sich aus Tabelle 5.

Tabelle 5: Zuordnung der Proben zum Biologischen Set

Biologisches Set:	Proben:	Biologisches Set:	Proben:
OB 3d 0ng	OB 001, OB 004, OB 007	FB 3d 250ng	FB 064, FB 067, FB 070
OB 7d 0ng	OB 002, OB 005, OB 008	FB 7d 250ng	FB 065, FB 068, FB 071
OB 10d 0ng	OB 003, OB 006, OB 009	FB 10d 250ng	FB 066, FB 069, FB 072
OB 3d 100ng	OB 028, OB 031, OB 034	FB 3d 500ng	FB 091, FB 094, FB 097
OB 7d 100ng	OB 029, OB 032, OB 035	FB 7d 500ng	FB 092, FB 095, FB 098
OB 10d 100ng	OB 030, OB 033, OB 036	FB 10d 500ng	FB 093, FB 096, FB 099
OB 3d 250ng	OB 055, OB 058, OB 061	I 3d 0ng	I 019, I 022, I 025
OB 7d 250ng	OB 056, OB 059, OB 062	I 7d 0ng	I 020, I 023, I 026
OB 10d 250ng	OB 057, OB 060, OB 063	I 10d 0ng	I 021, I 024, I 027
OB 3d 500ng	OB 082, OB 085, OB 088	I 3d 100ng	I 046, I 049, I 052
OB 7d 500ng	OB 083, OB 086, OB 089	I 7d 100ng	I 047, I 050, I 053
OB 10d 500ng	OB 084, OB 087, OB 090	I 10d 100ng	I 048, I 051, I 054
FB 3d 0ng	FB 010, FB 013, FB 016	I 3d 250ng	I 073, I 076, I 079
FB 7d 0ng	FB 011, FB 014, FB 017	I 7d 250ng	I 074, I 077, I 080
FB 10d 0ng	FB 012, FB 015, FB 018	I 10d 250ng	I 075, I 078, I 081
FB 3d 100ng	FB 037, FB 040, FB 043	I 3d 500ng	I 100, I 103, I 106
FB 7d 100ng	FB 038, FB 041, FB 044	I 7d 500ng	I 101, I 104, I 107
FB 10d 100ng	FB 039, FB 042, FB 045	I 10d 500ng	I 102, I 105, I 108

OB: aus Osteoblastenzone entnommen

FB: aus Fibroblastenzone entnommen

I: aus Intermediärzone entnommen

Xd: an Tag X nach Agarosestegentfernung entnommen

Xng: mit Xng/ml BMP2 bzw. 7 stimuliert

3.2.2. Durchgeführte Methodik

Um die gewonnene mRNA bezüglich der Expression der sehnenspezifischen Gene zu untersuchen, musste diese zuerst in cDNA umgeschrieben werden. Die cDNA ist eine der mRNA komplementären, antiparallelen Desoxyribonukleiddoppelstrangstruktur. Erster Schritt war also die cDNA Synthese. Die gewonnene cDNA wurde dann mittels quantitativer Real-Time Polymerase Chainreaktion (Real-Time PCR) hinsichtlich der Expression, der für die entsprechenden Proteine kodierenden Gene, untersucht. Wird ein Protein exprimiert, so ist dessen Gensequenz in der mRNA und somit auch in der cDNA enthalten. Spezielle Primer binden an diese Sequenzen und mittels einer Desoxyribonukleotid-Polymerase können diese in mehreren Zyklen exponentiell vermehrt werden. Die quantitative Vermehrung von DNA-Doppelsträngen konnte dann mittels UV-Licht, eines fluoreszierenden Farbstoffes sowie eines Detektionssystems bestimmt werden.

3.2.2.1. cDNA Synthese

Die cDNA Synthese wurde nach der Gebrauchsanweisung des Bio Rad 5x iScript Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR durchgeführt. Um die gewonnene mRNA in cDNA umzuschreiben, benötigt man für eine Reaktionslösung von 20µl, 1µg einer RNA Template, 4µl Bio Rad 5x iScript Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR sowie Nuclease-free Water in variabler Menge. Da die Proben mit der gewonnenen RNA unterschiedliche Konzentrationen besaßen, musste zuerst berechnet werden, wie viel µl Probe sowie Nuclease-free Water man pro Reaktionslösung benötigte.

Bei gegebener Konzentration (C) an RNA in einer Probe benötigt man X µl Lösung um ein 1µg RNA Template zu erhalten:

$$C [\mu\text{g} / \text{ml}] * X [\mu\text{l}] = 1\mu\text{g} \text{ oder } C / 1000 [\mu\text{g}/\mu\text{l}] * X [\mu\text{l}] = 1\mu\text{g}$$

Daraus folgt:

$$X [\mu\text{l}] = 1\mu\text{g} / (C / 1000 [\mu\text{g}/\mu\text{l}]) \text{ oder } X [\mu\text{l}] = 1000 / C [\mu\text{g}/\text{ml}]$$

Die benötigte Menge (Y) an Nuclease-free water berechnet sich dann wie folgt:

$$Y [\mu\text{l}] = 20\mu\text{l} (\text{Totales Volumen der Reaktionslösung}) - 4\mu\text{l} (\text{Bio Rad 5x iScript Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR}) - X [\mu\text{l}]$$

Einfacher dargestellt in dem in Tabelle 6 abgebildeten Schema, welches aus einer für die Berechnung angelegten Excel-Datei übernommen wurde:

Tabelle 6: Berechnungsschema der für die cDNA Synthese benötigten Menge an Reaktionslösungen

Konzentration der RNA in der Probe	Totales Volumen der Reaktionslösung	Bio Rad 5x iScript Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR	μl für $1\mu\text{g}$ RNA Template (X)	μl Nuclease- free Water (Y)
C [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	20 μl	4 μl	$1000 / C [\mu\text{g}/\text{ml}]$	$20\mu\text{l} - 4\mu\text{l} - X [\mu\text{l}]$

Die Reaktionslösungen wurden in einem 0,2ml Reaktionsgefäß (Eppendorf Polypropylene PCR Tube 0,2ml) angesetzt.

Anschließend wurden die Reaktionslösungen mit einem Thermal Cycler (FlexCycler, AnalytikJena, Jena, Deutschland) nach dem in Tabelle 7 beschriebenen Protokoll inkubiert.

Tabelle 7: Inkubationsprotokoll der cDNA Synthese

Priming	5 min bei 25 °C
Reverse Transkription	30 min bei 42°C
RT Inaktivierung	5 min bei 85°C

Wichtigstes Enzym dieser Reaktion ist die im Bio Rad 5x iScript Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR enthaltene Reverse Transkriptase (RT). Die RT wurde erstmals um 1970 durch Baltimore und Temin in RNA-Viren entdeckt und ist in der Lage RNA wie z.B. mRNA in cDNA zu überschreiben. (Jansohn M. 2007., Mülhardt C. 2009.)

Dazu benötigt sie Startmoleküle, sogenannte Primer, Desoxyribonukleotide, RNase und eine geeignete Pufferlösung. Dies ist in dem verwendeten Supermix entsprechend vorhanden. Die Primer binden an die 3'-Enden der mRNA. Das geschieht bei dieser Reaktion bei 25°C. Hier haben die eingesetzten Primer die höchste Aktivität. Die verwendete RT hat ihre höchste Aktivität bei 42°C. Sie bindet dann an die Primer und beginnt einzelne Desoxyribonukleotide zu komplementären DNA-Strängen zu synthetisieren. Bei 85°C kommt es zur Denaturierung der RT und damit zu deren Inaktivierung. Gleichzeitig wird dann die RNase aktiv und beginnt die RNA abzubauen. (Jansohn M. 2007., Mülhardt C. 2009.)

Die gewonnenen cDNA Proben wurden 1:3 (Lauf A, B, F) oder 1:4 (Lauf E) mit destilliertem, autoklaviertem Wasser in 0,2ml Reaktionsgefäß (Eppendorf Polypropylene PCR Tube 0,2ml) verdünnt.

3.2.2.2. Quantitative Real-Time PCR

Jede gewonnene cDNA Probe wurde zusammen mit dem Mastermix (siehe unten) in drei Wells pro Platte gegeben, um später dann ein Mittelwert bei der Berechnung der Expression der untersuchten Gene (Targets) bilden zu können. Für die Läufe A, E und F wurden folgende PCR Platten verwendet: VWR low profile flat 96 PCR plate with printed labels 0,2ml. Für Lauf B aufgrund von Lieferengpässen bei VWR folgende Platten: Peqlab low profile 96 well PCR plate.

Die Abbildungen 2-5 zeigen die verwendeten Pipettierschemata der PCR Platten für alle Läufe und alle untersuchten Gene (X).

0ng/ml Stimulation:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Unk-1	Unk-1	Unk-1	Unk-2	Unk-2	Unk-2	Unk-3	Unk-3	Unk-3	Unk-25	Std-1	Std-1
	X OB 1	X OB 1	X OB 1	X OB 2	X OB 2	X OB 2	X OB 3	X OB 3	X OB 3	X 1 25	X	X
B	Unk-4	Unk-4	Unk-4	Unk-5	Unk-5	Unk-5	Unk-6	Unk-6	Unk-6	Unk-25	Std-2	Std-2
	X OB 4	X OB 4	X OB 4	X OB 5	X OB 5	X OB 5	X OB 6	X OB 6	X OB 6	X 1 25	X	X
C	Unk-7	Unk-7	Unk-7	Unk-8	Unk-8	Unk-8	Unk-9	Unk-9	Unk-9	Unk-25	Std-3	Std-3
	X OB 7	X OB 7	X OB 7	X OB 8	X OB 8	X OB 8	X OB 9	X OB 9	X OB 9	X 1 25	X	X
D	Unk-10	Unk-10	Unk-10	Unk-11	Unk-11	Unk-11	Unk-12	Unk-12	Unk-12	Unk-26	Std-4	Std-4
	X FB 10	X FB 10	X FB 10	X FB 11	X FB 11	X FB 11	X FB 12	X FB 12	X FB 12	X 1 26	X	X
E	Unk-13	Unk-13	Unk-13	Unk-14	Unk-14	Unk-14	Unk-15	Unk-15	Unk-15	Unk-26	Std-5	Std-5
	X FB 13	X FB 13	X FB 13	X FB 14	X FB 14	X FB 14	X FB 15	X FB 15	X FB 15	X 1 26	X	X
F	Unk-16	Unk-16	Unk-16	Unk-17	Unk-17	Unk-17	Unk-18	Unk-18	Unk-18	Unk-26	NTC	NTC
	X FB 16	X FB 16	X FB 16	X FB 17	X FB 17	X FB 17	X FB 18	X FB 18	X FB 18	X 1 26	X	X
G	Unk-19	Unk-19	Unk-19	Unk-20	Unk-20	Unk-20	Unk-21	Unk-21	Unk-21	Unk-27		
	X 1 19	X 1 19	X 1 19	X 1 20	X 1 20	X 1 20	X 1 21	X 1 21	X 1 21	X 1 27		
H	Unk-22	Unk-22	Unk-22	Unk-23	Unk-23	Unk-23	Unk-24	Unk-24	Unk-24	Unk-27	Unk-27	
	X 1 22	X 1 22	X 1 22	X 1 23	X 1 23	X 1 23	X 1 24	X 1 24	X 1 24	X 1 27	X 1 27	

Abbildung 3: Plattenschema für nicht stimulierte Proben

100ng/ml Stimulation:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Unk-1	Unk-1	Unk-1	Unk-2	Unk-2	Unk-2	Unk-3	Unk-3	Unk-3	Unk-25	Std-6	Std-6
	X OB 28	X OB 28	X OB 28	X OB 29	X OB 29	X OB 29	X OB 30	X OB 30	X OB 30	X 1 52	X	X
B	Unk-4	Unk-4	Unk-4	Unk-5	Unk-5	Unk-5	Unk-6	Unk-6	Unk-6	Unk-25	Std-7	Std-7
	X OB 31	X OB 31	X OB 31	X OB 32	X OB 32	X OB 32	X OB 33	X OB 33	X OB 33	X 1 52	X	X
C	Unk-7	Unk-7	Unk-7	Unk-8	Unk-8	Unk-8	Unk-9	Unk-9	Unk-9	Unk-25	Std-8	Std-8
	X OB 34	X OB 34	X OB 34	X OB 35	X OB 35	X OB 35	X OB 36	X OB 36	X OB 36	X 1 52	X	X
D	Unk-10	Unk-10	Unk-10	Unk-11	Unk-11	Unk-11	Unk-12	Unk-12	Unk-12	Unk-26	Std-9	Std-9
	X FB 37	X FB 37	X FB 37	X FB 38	X FB 38	X FB 38	X FB 39	X FB 39	X FB 39	X 1 53	X	X
E	Unk-13	Unk-13	Unk-13	Unk-14	Unk-14	Unk-14	Unk-15	Unk-15	Unk-15	Unk-26	Std-10	Std-10
	X FB 40	X FB 40	X FB 40	X FB 41	X FB 41	X FB 41	X FB 42	X FB 42	X FB 42	X 1 53	X	X
F	Unk-16	Unk-16	Unk-16	Unk-17	Unk-17	Unk-17	Unk-18	Unk-18	Unk-18	Unk-26	NTC	NTC
	X FB 43	X FB 43	X FB 43	X FB 44	X FB 44	X FB 44	X FB 45	X FB 45	X FB 45	X 1 53	X	X
G	Unk-19	Unk-19	Unk-19	Unk-20	Unk-20	Unk-20	Unk-21	Unk-21	Unk-21	Unk-27		
	X 1 46	X 1 46	X 1 46	X 1 47	X 1 47	X 1 47	X 1 48	X 1 48	X 1 48	X 1 54		
H	Unk-22	Unk-22	Unk-22	Unk-23	Unk-23	Unk-23	Unk-24	Unk-24	Unk-24	Unk-27	Unk-27	
	X 1 49	X 1 49	X 1 49	X 1 50	X 1 50	X 1 50	X 1 51	X 1 51	X 1 51	X 1 54	X 1 54	

Abbildung 4: Plattenschema für alle mit 100ng/ml stimulierten Proben

250ng/ml Stimulation:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Unk-1	Unk-1	Unk-1	Unk-2	Unk-2	Unk-2	Unk-3	Unk-3	Unk-3	Unk-25	Std-11	Std-11
	X OB 55	X OB 55	X OB 55	X OB 56	X OB 56	X OB 56	X OB 57	X OB 57	X OB 57	X 1 79	X	X
B	Unk-4	Unk-4	Unk-4	Unk-5	Unk-5	Unk-5	Unk-6	Unk-6	Unk-6	Unk-25	Std-12	Std-12
	X OB 58	X OB 58	X OB 58	X OB 59	X OB 59	X OB 59	X OB 60	X OB 60	X OB 60	X 1 79	X	X
C	Unk-7	Unk-7	Unk-7	Unk-8	Unk-8	Unk-8	Unk-9	Unk-9	Unk-9	Unk-25	Std-13	Std-13
	X OB 61	X OB 61	X OB 61	X OB 62	X OB 62	X OB 62	X OB 63	X OB 63	X OB 63	X 1 79	X	X
D	Unk-10	Unk-10	Unk-10	Unk-11	Unk-11	Unk-11	Unk-12	Unk-12	Unk-12	Unk-26	Std-14	Std-14
	X FB 64	X FB 64	X FB 64	X FB 65	X FB 65	X FB 65	X FB 66	X FB 66	X FB 66	X 1 80	X	X
E	Unk-13	Unk-13	Unk-13	Unk-14	Unk-14	Unk-14	Unk-15	Unk-15	Unk-15	Unk-26	Std-15	Std-15
	X FB 67	X FB 67	X FB 67	X FB 68	X FB 68	X FB 68	X FB 69	X FB 69	X FB 69	X 1 80	X	X
F	Unk-16	Unk-16	Unk-16	Unk-17	Unk-17	Unk-17	Unk-18	Unk-18	Unk-18	Unk-26	NTC	NTC
	X FB 70	X FB 70	X FB 70	X FB 71	X FB 71	X FB 71	X FB 72	X FB 72	X FB 72	X 1 80	X	X
G	Unk-19	Unk-19	Unk-19	Unk-20	Unk-20	Unk-20	Unk-21	Unk-21	Unk-21	Unk-27		
	X 1 73	X 1 73	X 1 73	X 1 74	X 1 74	X 1 74	X 1 75	X 1 75	X 1 75	X 1 81		
H	Unk-22	Unk-22	Unk-22	Unk-23	Unk-23	Unk-23	Unk-24	Unk-24	Unk-24	Unk-27	Unk-27	
	X 1 76	X 1 76	X 1 76	X 1 77	X 1 77	X 1 77	X 1 78	X 1 78	X 1 78	X 1 81	X 1 81	

Abbildung 5: Plattenschema für alle mit 250ng/ml stimulierten Proben

500ng/ml Stimulation:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Unk-1	Unk-1	Unk-1	Unk-2	Unk-2	Unk-2	Unk-3	Unk-3	Unk-3	Unk-25	Std-16	Std-16
	X OB 82	X OB 82	X OB 82	X OB 83	X OB 83	X OB 83	X OB 84	X OB 84	X OB 84	X 1 106	X	X
B	Unk-4	Unk-4	Unk-4	Unk-5	Unk-5	Unk-5	Unk-6	Unk-6	Unk-6	Unk-25	Std-17	Std-17
	X OB 85	X OB 85	X OB 85	X OB 86	X OB 86	X OB 86	X OB 87	X OB 87	X OB 87	X 1 106	X	X
C	Unk-7	Unk-7	Unk-7	Unk-8	Unk-8	Unk-8	Unk-9	Unk-9	Unk-9	Unk-25	Std-18	Std-18
	X OB 88	X OB 88	X OB 88	X OB 89	X OB 89	X OB 89	X OB 90	X OB 90	X OB 90	X 1 106	X	X
D	Unk-10	Unk-10	Unk-10	Unk-11	Unk-11	Unk-11	Unk-12	Unk-12	Unk-12	Unk-26	Std-19	Std-19
	X FB 91	X FB 91	X FB 91	X FB 92	X FB 92	X FB 92	X FB 93	X FB 93	X FB 93	X 1 107	X	X
E	Unk-13	Unk-13	Unk-13	Unk-14	Unk-14	Unk-14	Unk-15	Unk-15	Unk-15	Unk-26	Std-20	Std-20
	X FB 94	X FB 94	X FB 94	X FB 95	X FB 95	X FB 95	X FB 96	X FB 96	X FB 96	X 1 107	X	X
F	Unk-16	Unk-16	Unk-16	Unk-17	Unk-17	Unk-17	Unk-18	Unk-18	Unk-18	Unk-26	NTC	NTC
	X FB 97	X FB 97	X FB 97	X FB 98	X FB 98	X FB 98	X FB 99	X FB 99	X FB 99	X 1 107	X	X
G	Unk-19	Unk-19	Unk-19	Unk-20	Unk-20	Unk-20	Unk-21	Unk-21	Unk-21	Unk-27		
	X 1 100	X 1 100	X 1 100	X 1 101	X 1 101	X 1 101	X 1 102	X 1 102	X 1 102	X 1 108		
H	Unk-22	Unk-22	Unk-22	Unk-23	Unk-23	Unk-23	Unk-24	Unk-24	Unk-24	Unk-27	Unk-27	
	X 1 103	X 1 103	X 1 103	X 1 104	X 1 104	X 1 104	X 1 105	X 1 105	X 1 105	X 1 108	X 1 108	

Abbildung 6: Plattenschema für alle mit 500ng/ml stimulierten Proben

Die quantitative Real-Time PCR wurde nach der Gebrauchsanweisung des Bio Rad SsoFast Eva Green Super Mix Kit durchgeführt. Für jede Platte musste ein sogenannter Mastermix angesetzt werden. Dies erfolgte mit den Primern von Sigma-Aldrich für 93 Reaktionen plus 8% Überstand nach dem in Tabelle 8 beschriebenen Pipettierschema.

Tabelle 8: Pipettierschema für Mastermix mit Primern von Sigma-Aldrich

Komponente	Volumen pro Reaktion [μ l]
Bio Rad SsoFast Eva Green Super Mix	1004,4
10 μ M Forward Primer	40,2
10 μ M Reverse Primer	40,2
H ₂ O (destilliert, autoklaviert)	823,6
Gesamtvolumen	1908,4

Für 100 Reaktionen (93 Reaktionen plus Überstand) mit den Primern von Qiagen wurde der Mastermix nach dem in Tabelle 9 beschriebenen Schema angesetzt.

Tabelle 9: Pipettierschema für Mastermix mit Primern von Qiagen

Komponente	Volumen pro Reaktion [μ l]
Bio Rad SsoFast Eva Green Super Mix	1000
10 μ M Primer	200
H ₂ O (destilliert, autoklaviert)	700
Gesamtvolumen	1900

Ein Mastermix wurde in einem 2,0ml Reaktionsgefäß (Sarstedt SafeSeal Micro Tubes 2,0ml) angesetzt. In jedes Well einer PCR Platte wurden dann 19 μ l des entsprechenden Mastermix sowie 1 μ l der entsprechenden cDNA Probe pipettiert.

Als Standardreihe wurden Ansätze verwendet, die die gleiche Menge von jeder cDNA Probe pro Platte enthielten. So wurde z.B. für eine Platte eines beliebigen Laufes, mit einem beliebigen Target bei einer Stimulationskonzentration von 0ng/ml, 1 μ l der cDNA Proben OB 001-OB 009,

FB 010- FB 018, I 017-I027 zu Standard 1 in einem 0,2ml Reaktionsgefäß (Eppendorf PCR Tube 0,2 ml) zusammen pipettiert. Die Standards 2 bis 5 wurden durch eine fortlaufende Verdünnungsreihe von jeweils 1:10 gebildet. Damit ergeben sich für eine Standardreihe die in Tabelle 10 beschriebenen Konzentrationen:

Tabelle 10: Konzentrationen der Standardreihe

Standard	Konzentration
1	1,00E+00 = 1:1
2	1,00E-01 = 1:10
3	1,00E-02 = 1:100
4	1,00E-03 = 1:1000
5	1,00E-04 = 1:10000

Die PCR Platten wurden anschließend mit stark klebender Sarstedt PCR Folie versiegelt und die Reaktionen mit Hilfe des Bio Rad CFX96 Real-Time PCR Detection System durchgeführt. Dies geschah mit dem in Tabelle 11 dargestellten Real-Time PCR Programm.

Tabelle 11: Programm der Real-Time PCR

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [sec]	Zyklen
Enzymaktivierung	95	30	1
Denaturierung	95	5	44
Primerhybridisierung (Annealing) und DNA-Strang Synthese	60	10	44
Schmelzkurve	65 auf 95	5	1

Die bei dieser Versuchsreihe durchgeführte Methode der quantitativen Real-Time PCR basiert darauf, dass ein Fluoreszenzfarbstoff an die ursprünglichen cDNA-Doppelstränge und die während der PCR neu synthetisierten DNA-Doppelstränge bindet und nach Anregung durch einfallendes UV-Licht spontan ein energieärmeres Licht emittiert. Dadurch kann mittels UV-Licht, das von einer UV-Lampe kommend die Probe passiert, der an die DNA gebundene

Farbstoff angeregt und dessen Lichtemission (Fluoreszenzsignal) anschließend von einer charge-coupled device (CCD) Kamera erfasst werden. Je mehr DNA zur Verfügung steht, desto mehr Farbstoff kann binden und das Fluoreszenzsignal nimmt zu. So kann die quantitative Änderung der Konzentration an DNA in einer Probe durch Änderung des Fluoreszenzsignals bestimmt werden. Der sogenannte Cq-Wert beschreibt den Zyklus, bei dem zum ersten Mal ein signifikant verändertes Fluoreszenzsignal vom unspezifischen Hintergrund zu messen ist. (Jansohn M. 2007., Mülhardt C. 2009.)

Der verwendete Bio Rad SsoFast Eva Green Super Mix enthält als Fluoreszenzfarbstoff Eva Green, das ähnlich wie der Farbstoff SYBR Green I in die DNA interkaliert, aber die DNA Synthese durch die Polymerase nicht beeinträchtigt. Somit sind schnelle Zyklen sowie schnelle PCR Protokolle möglich. Des Weiteren enthält der Bio Rad SsoFast Eva Green Super Mix Desoxyribonukleotide, eine DNA-Polymerase und das DNA-Bindungsprotein Sso-7d, welches den Polymerase-DNA-Strang-Komplex stabilisiert. Die Primer und die cDNA Proben wurden wie bereits beschrieben zusätzlich hinzugegeben.

Im ersten Reaktionsschritt wurden die Reaktionslösungen für 30 Sekunden auf 95°C erhitzt. Dadurch wurden die enthaltenen Enzyme aktiv. Im nächsten Schritt kam es zur Denaturierung der cDNA-Doppelstränge bei ebenfalls 95°C. Die Wasserstoffbrücken zwischen den Strängen lösten sich und es entstanden cDNA-Einzelstränge. Dieser Vorgang dauerte 5 Sekunden. Anschließend kühlte die Maschine die Lösungen auf 65 °C ab. Nun konnten die Primer an die Einzelstränge hybridisieren. Damit ist eine Bindung an entsprechende Startsequenzen der zu untersuchenden Gensequenzen gemeint, wenn diese exprimiert waren. Die Bindung wurde durch das Sso-7d Bindungsprotein stabilisiert. Waren Primer und cDNA-Strang hybridisiert, begann die DNA-Polymerase vom 3' Ende der Primer aus einen neuen antiparallelen DNA-Strang aus freien Desoxyribonukleotiden zu synthetisieren. Dieser Vorgang dauerte 10 Sekunden. Die cDNA-Stränge wurden also beim Vorhandensein der entsprechenden Gensequenz verdoppelt. Enthielt die cDNA nicht die

Genesequenz eines hinsichtlich der Expression untersuchten Gens, gab es keine bzw. nur minimale DNA Vermehrung (Artefakte). Denaturierung, Hybridisierung und DNA-Strang Synthese wurden in der gleichen Reihenfolge 44 Mal wiederholt. Dabei vermehrte sich die DNA beim Vorhandensein der passenden Startsequenzen exponentiell. Nach jedem dieser Zyklen interkalierte das Eva Green in die neu gebildeten DNA-Doppelstränge. Kam es also zur Konzentrationssteigerung der DNA, änderte sich auch das nach jedem dieser Zyklen gemessene Fluoreszenzsignal. Im letzten Schritt wurden die Reaktionslösungen in 5 Sekunden von 65 auf 95°C erhitzt, um die Schmelzpunkte der einzelnen Lösungen zu bestimmen. Da die DNA hierbei wieder denaturiert wurde, löste sich das interkalierende Eva Green aus den DNA-Doppelsträngen. Es konnte dann eine erneute Fluoreszenzänderung gemessen werden.

Alle Wells einer Platte, welche die gleiche cDNA enthielten, sollten nicht nur annähernd gleiche Cq-Werte aufweisen, sondern auch annähernd gleiche Schmelzkurven zeigen. War dies nicht der Fall, deutet das auf eine Verunreinigung der Reaktionslösung innerhalb eines oder mehrerer Wells hin. Die Schmelzkurvenbestimmung diente als zusätzliche Qualitätskontrolle.

Eine weitere Qualitätskontrolle war die Konzentrationsbestimmung in der Standardreihe. Standard 1 enthielt cDNA von allen Proben einer Platte, die Standards 2 bis 5 waren jeweils 1:10 zum vorangehenden Standard verdünnt. Dementsprechend sollte die DNA Konzentration nach Real-Time PCR von Standard 1 hin zu Standard 5 abnehmen bzw. die Cq-Werte zunehmen. Erstellt man ein Diagramm, bei dem die Verdünnung der Standards logarrhythmisch auf die X-Achse aufgetragen wird und die Cq-Werte auf die Y-Achse, dann sollten die Mittelwerte der Standardreihe idealerweise so liegen, dass man durch diese Punkte eine Ausgleichsgerade mit einer Steigung von 1 legen kann.

Die vom Bio Rad CFX96 Real-Time PCR Detection System gemessenen Cq-Werte wurden dann mit Hilfe des Bio Rad CFX Manager 3.0-Programms analysiert.

3.2.3. Auswertung und Statistik

Die gemessenen Cq-Werte wurden aus dem CFX Manager in eine Excel Tabelle überführt, die relative Expression nach einer erweiterten $\Delta\Delta Cq$ -Methode berechnet und auf die drei Tage Werte bei 0ng/ μ l BMP-Stimulation in der entsprechenden Zone des zu untersuchenden Gens normiert. Zur Berechnung der Expression wurden Cq-Werte von Actinin β (ACTB) und Hypoxantin-Guanin-Phosphorybosyltransferase (HPRT) als Housekeeping-Gene verwendet. Hierfür wurde Microsoft Excel for Mac, version 14.1.0 (Microsoft, Redmond, USA) genutzt.

Im Anschluss wurden die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der biologischen Sets berechnet. Die erhobenen Daten wurden mittels deskriptiver Statistik analysiert. In einem zunächst durchgeführten Chi-Quadrat-Test zeigte sich, dass hinsichtlich des Expressionsverhaltens keine Normalverteilung zwischen den biologischen Sets vorlag und somit die Nullhypothese abgelehnt werden konnte. Es erfolgte hiernach eine Varianzanalyse (ANOVA) mit post-hoc Test nach Tukey zum Vergleich der Genexpression der biologischen Sets untereinander. Hierdurch wurde untersucht, ob es signifikante Expressionsänderungen eines Gens zu einem definierten Zeitpunkt (Tag drei, Tag fünf oder Tag zehn) zwischen den unterschiedlichen Stimulationsdosierungen (0ng/ml, 100ng/ml, 250ng/ml und 500ng/ml), nach gleichem Stimulationsmodus (singuläre oder multiple Stimulation mit BMP2 oder BMP7) gab. Als statistisch signifikant wurden p-Werte kleiner 0,05 festgelegt. Für die statistische Auswertung wurde das Statistical Package for Social Science for Mac, Version 22 (SPSS, Chicago, USA) verwendet. Die Grafiken wurden mit Microsoft Excel erstellt.

4. Ergebnisse

4.1. Expression von COL1A1

4.1.1. Singuläre Stimulation mit BMP2

Die Expression von COL1A1 war im Bereich der Präosteoblasten durch die singuläre Stimulation mit BMP2 dosisunabhängig reduziert. Die nicht stimulierten Proben zeigten im zeitlichen Verlauf einen Anstieg der Expression. Dabei waren die Änderungen der Expression zwischen stimulierten und nicht stimulierten zu jedem Zeitpunkt signifikant. Die Expressionsänderungen zwischen den stimulierten Proben war mit Ausnahme der zwischen 250ng/ml und 500ng/ml ebenfalls zu jedem Zeitpunkt signifikant.

In der Intermediärzone zeigte sich eine gesteigerte Expression bei allen mit mehr als 250ng/ml stimulierten Proben, unabhängig vom Zeitpunkt. Diese war an Tag drei mit einer 1,134-fachen, relativen Expression bei den mit 250ng/ml stimulierten und einer 1,263-fachen bei den mit 500ng/ml stimulierten Proben am höchsten. Die Änderungen der Expression zwischen den genannten Proben und den anderen war an Tag drei signifikant. An Tag sieben und zehn war die Expressionsänderung der mit 250ng/ml stimulierten Proben im Vergleich zu den nicht und mit 100ng/ml stimulierten signifikant.

Im Bereich der Fibroblasten war die Expression von COL1A1 zu jedem Zeitpunkt gesteigert. Dabei zeigten die stimulierten Proben im Verlauf eine höhere Expression als die nicht stimulierten zum selben Zeitpunkt. Ausnahme hierbei waren die mit 100ng/ml stimulierten an Tag sieben. Diese Expressionsänderung war im Vergleich zu den nicht stimulierten Proben zum selben Zeitpunkt jedoch nicht signifikant. Bei den mit 250ng/ml stimulierten Proben kam es an Tag zehn zu einem 1,401-fachen Anstieg der relativen Expression, welcher im Vergleich zu den anderen Proben signifikant war.

Zusammenfassen kann man sagen, dass die singuläre Stimulation mit BMP2 zu einer Abnahme der Expression von COL1A1 in den Präosteoblasten führte, es in der Intermediärzone zu einer dosisabhängigen Steigerung ab 250ng/ml kam

und die Fibroblasten auf die Stimulation mit einer Zunahme der relativen Expression reagierten. (Siehe Abbildungen 6,7 und 8 sowie Tabelle 12)

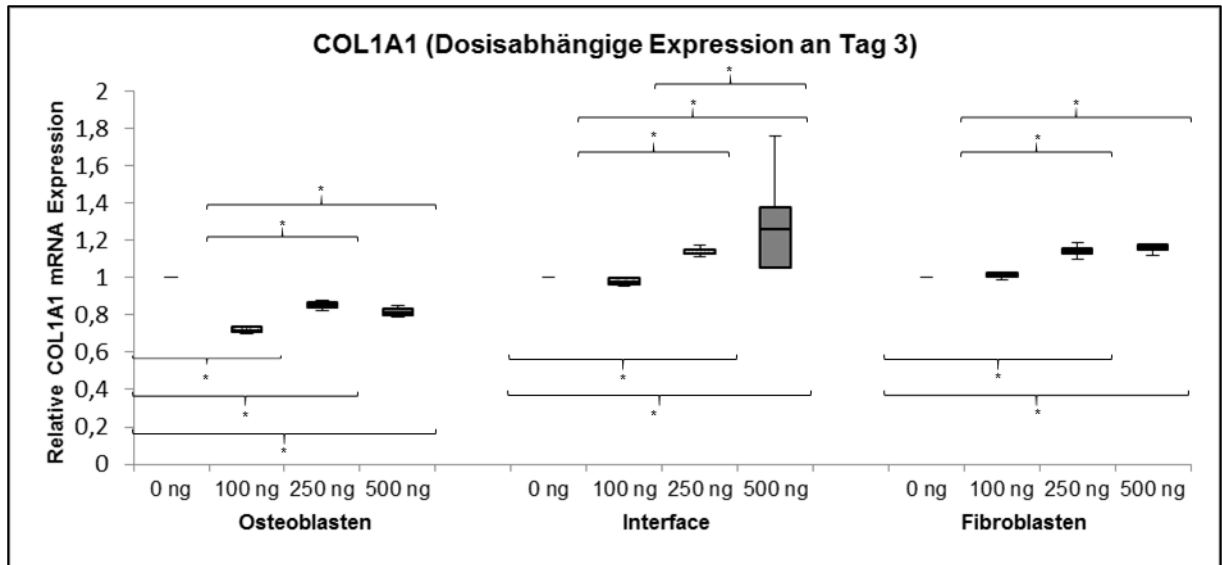


Abbildung 7: Graphische Darstellung der Expression von COL1A1 nach drei Tagen singulärer Stimulation mit BMP2

Mittlerer Querstrich: Median

Oberer und unterer Querstrich: Minimum und Maximum

Obere und untere Begrenzung des Kastens: 25. und 75. Perzentile

* Die Änderung der Expression zwischen diesen Proben ist signifikant ($p < 0,05$)

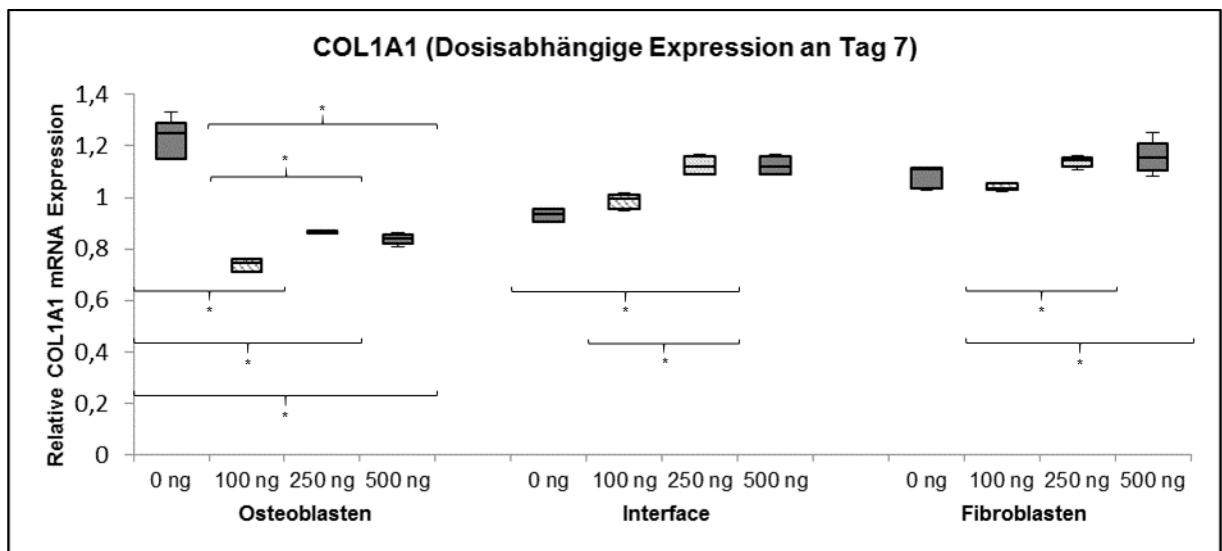


Abbildung 8: Graphische Darstellung der Expression von COL1A1 nach sieben Tagen singulärer Stimulation mit BMP2

Mittlerer Querstrich: Median

Oberer und unterer Querstrich: Minimum und Maximum

Obere und untere Begrenzung des Kastens: 25. und 75. Perzentile

* Die Änderung der Expression zwischen diesen Proben ist signifikant ($p < 0,05$)

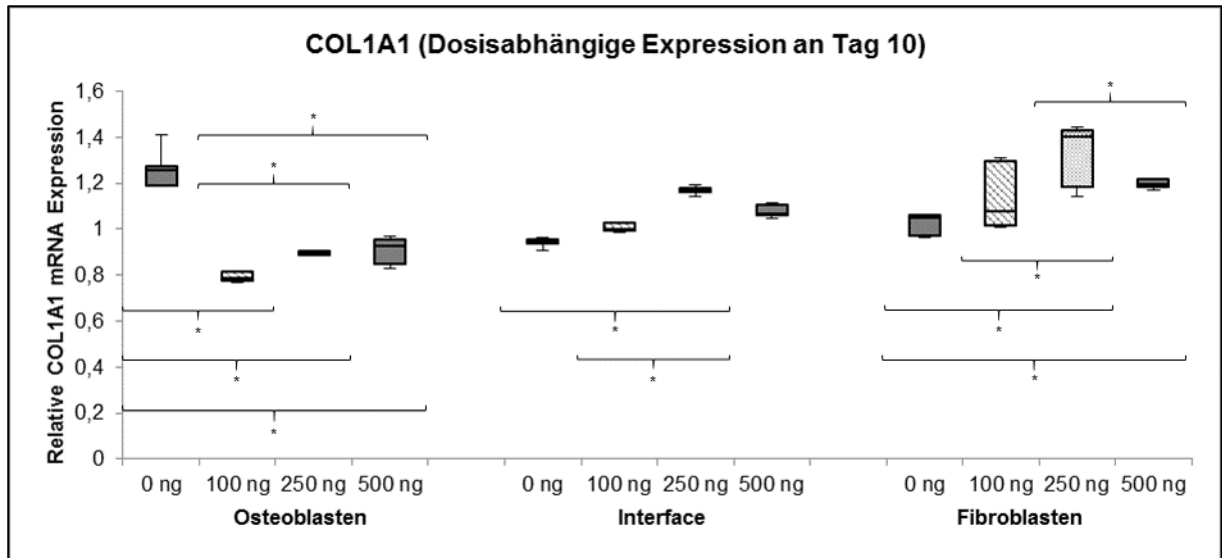


Abbildung 9: Graphische Darstellung der Expression von COL1A1 nach zehn Tagen singulärer Stimulation mit BMP2

Mittlerer Querstrich: Median

Oberer und unterer Querstrich: Minimum und Maximum

Obere und untere Begrenzung des Kastens: 25. und 75. Perzentile

* Die Änderung der Expression zwischen diesen Proben ist signifikant ($p < 0,05$)

Tabelle 12: Relative Expression von COL1A1 nach singulärer Stimulation mit BMP2

RE COL1A1 nach singulärer Stimulation mit BMP2 an Tag 3			
	Präosteoblasten	Intermediärzone	Fibroblasten
0ng/ml			
100ng/ml	0,720	0,981	1,010
250ng/ml	0,852	1,134	1,148
500ng/ml	0,816	1,263	1,166
RE COL1A1 nach singulärer Stimulation mit BMP2 an Tag 7			
	Präosteoblasten	Intermediärzone	Fibroblasten
0ng/ml	1,249	0,934	1,109
100ng/ml	0,748	0,995	1,036
250ng/ml	0,864	1,122	1,146
500ng/ml	0,840	1,122	1,135
RE COL1A1 nach singulärer Stimulation mit BMP2 an Tag 10			
	Präosteoblasten	Intermediärzone	Fibroblasten
0ng/ml	1,259	0,951	1,051
100ng/ml	0,785	0,998	1,076
250ng/ml	0,901	1,166	1,401
500ng/ml	0,926	1,066	1,197

4.1.2. Multiple Stimulation mit BMP2

Die Expression von COL1A1 im Bereich der Präosteoblasten zeigte ein diffuses Bild. Die nicht stimulierten Proben zeigten an Tag sieben einen 1,529-fachen Anstieg der relativen Expression. Dieser war zu den mit 100ng/ml und 250ng/ml stimulierten Proben zum gleichen Zeitpunkt signifikant. An Tag zehn zeigte die mit 100ng/ml BMP2 multipel stimulierten Proben einen zu den anderen Proben signifikanten, 1,239-fachen Anstieg der relativen Expression. Weitere signifikante Expressionsänderungen waren nicht auszumachen. Bei den stimulierten Proben zeigten sich mehrere reduzierte Expressionsergebnisse. Im Falle einer gesteigerten Expression war diese jedoch geringer als die der nicht stimulierten Proben zum selben Zeitpunkt.

In der Intermediärzone zeigte sich bei den meisten stimulierten Proben eine zu den anderen Proben nicht signifikante, reduzierten Expression. An Tag sieben zeigten die mit 100ng/ml und 500ng/ml stimulierten Proben jedoch einen 1,163-fachen (100ng/ml) bzw. 1,383-fachen (500ng/ml) Anstieg der relativen Expression. Dieser war dann im Vergleich zu den nicht stimulierten Proben signifikant.

Im Bereich der Fibroblasten war die relative Expression von COL1A1 in den stimulierten Proben reduziert oder im Vergleich zu den nicht stimulierten Proben zum selben Zeitpunkt geringer ausgeprägt. Es bestanden hier keine signifikanten Expressionsänderungen zwischen den Proben. An Tag zehn zeigten die nicht stimulierten Proben einen 1,214-fachen Anstieg der relativen Expression. Dieser war zu den mit 100ng/ml und 500ng/ml stimulierten Proben signifikant.

Zusammenfassend bestand durch die multiple Stimulation mit BMP2 eine nicht signifikant reduzierte Expression von COL1A1 in den stimulierten Proben. Diese war unabhängig von Zeitpunkt und Dosis sowohl im Bereich der Präosteoblasten, Fibroblasten und in der Intermediärzone zu finden. Vereinzelt zeigten sich jedoch signifikante Expressionsanstiege. (Siehe Abbildungen 9,10 und 11 sowie Tabelle 13)

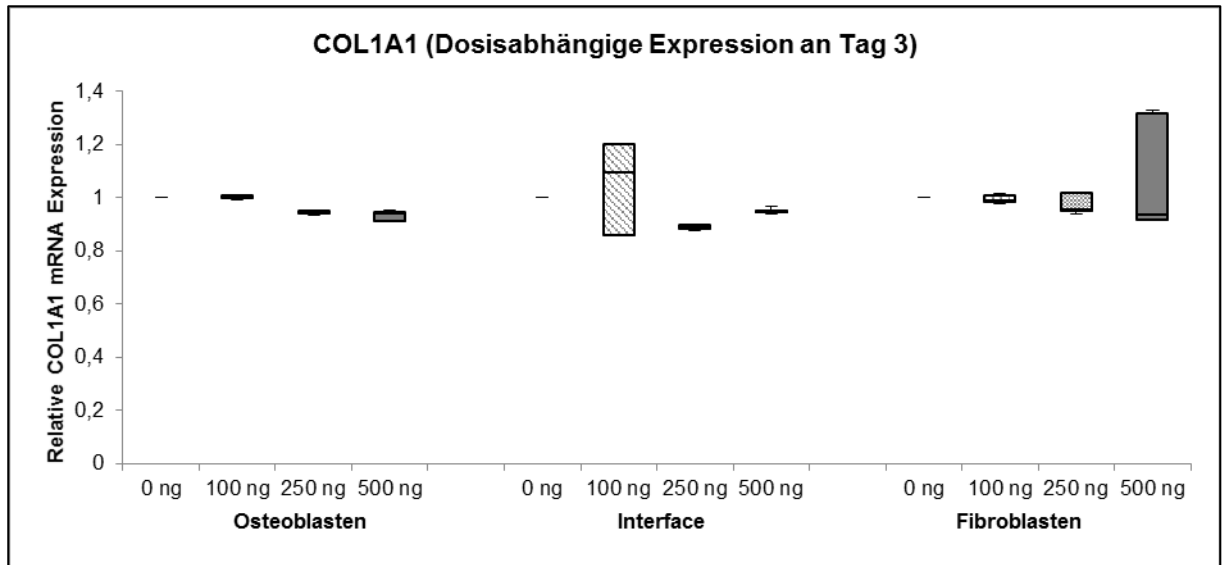


Abbildung 10: Graphische Darstellung der Expression von COL1A1 nach drei Tagen multipler Stimulation mit BMP2

Mittlerer Querstrich: Median

Oberer und unterer Querstrich: Minimum und Maximum

Obere und untere Begrenzung des Kastens: 25. und 75. Perzentile

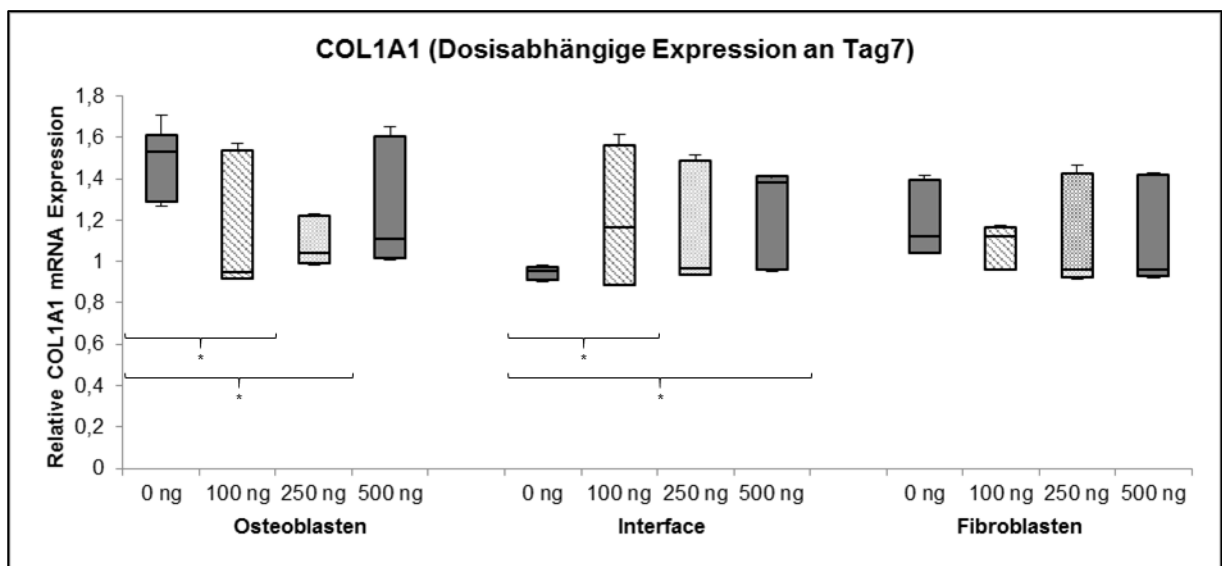


Abbildung 11: Graphische Darstellung der Expression von COL1A1 nach sieben Tagen multipler Stimulation mit BMP2

Mittlerer Querstrich: Median

Oberer und unterer Querstrich: Minimum und Maximum

Obere und untere Begrenzung des Kastens: 25. und 75. Perzentile

* Die Änderung der Expression zwischen diesen Proben ist signifikant ($p < 0,05$)

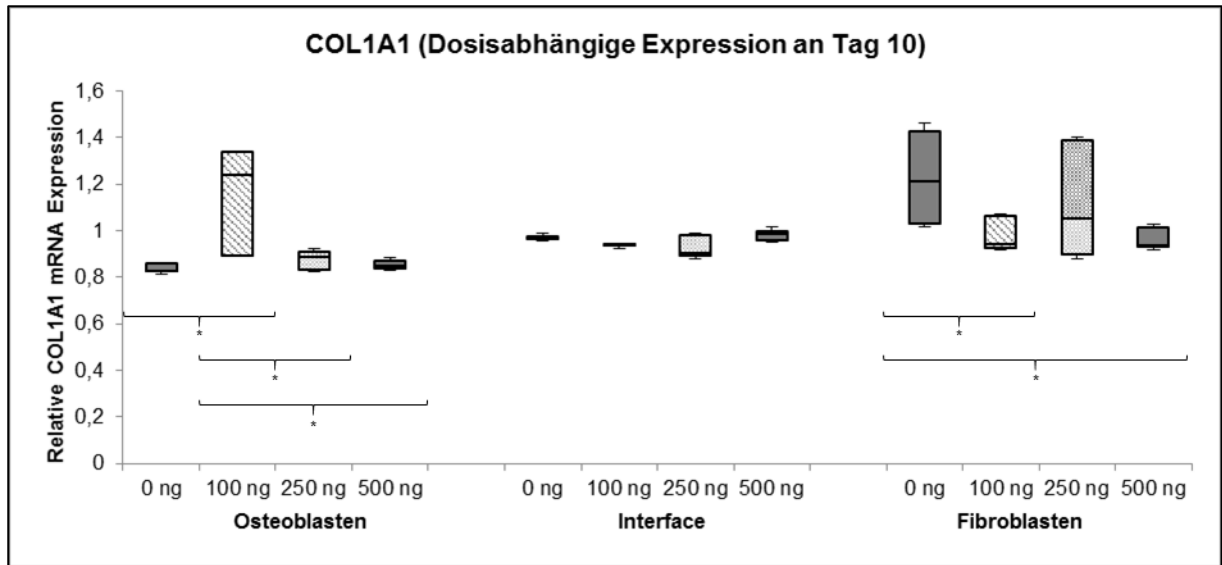


Abbildung 12: Graphische Darstellung der Expression von COL1A1 nach zehn Tagen multipler Stimulation mit BMP2

Mittlerer Querstrich: Median

Oberer und unterer Querstrich: Minimum und Maximum

Obere und untere Begrenzung des Kastens: 25. und 75. Perzentile

* Die Änderung der Expression zwischen diesen Proben ist signifikant ($p < 0,05$)

Tabelle 13: Relative Expression von COL1A1 nach multipler Stimulation mit BMP2

RE COL1A1 nach multipler Stimulation mit BMP2 an Tag 3			
	Präosteoblasten	Intermediärzone	Fibroblasten
0ng/ml			
100ng/ml	1,001	1,093	0,986
250ng/ml	0,944	0,887	0,952
500ng/ml	0,942	0,944	0,937
RE COL1A1 nach multipler Stimulation mit BMP2 an Tag 7			
	Präosteoblasten	Intermediärzone	Fibroblasten
0ng/ml	1,529	0,957	1,123
100ng/ml	0,920	1,163	1,120
250ng/ml	1,040	0,964	0,961
500ng/ml	1,109	1,383	0,963
RE COL1A1 nach multipler Stimulation mit BMP2 an Tag 10			
	Präosteoblasten	Intermediärzone	Fibroblasten
0ng/ml	0,829	0,969	1,214
100ng/ml	1,239	0,938	0,941
250ng/ml	0,886	0,905	1,053
500ng/ml	0,846	0,987	0,939

4.1.3. Singuläre Stimulation mit BMP7

Die relative Expression von COL1A1 war im Bereich der Präosteoblasten bei den mit 100ng/ml stimulierten Proben um das 1,073-fache an Tag drei und das 1,024-fache an Tag sieben, im Vergleich zu den anderen Proben signifikant gesteigert. An Tag zehn war keine relative Expressionsänderung der mit 100ng/ml stimulierten Proben auszumachen. In den anderen Proben zeigten sich zu jedem Zeitpunkt eine reduzierte Expression.

In der Intermediärzone zeigten die mit 100ng/ml stimulierten Proben an Tag drei, sieben und zehn eine um das 1,079-, 1,030- bzw. 1,028-fache gesteigerte Expression. Die Änderungen der Expression der mit 100ng/ml stimulierten Proben war im Vergleich zu den anderen zu jedem Zeitpunkt signifikant. An Tag drei zeigten die anderen stimulierten Proben eine gesteigerte, an Tag sieben und zehn reduzierte Expression. Hier bestanden keine signifikanten Änderungen der Expression untereinander.

Im Bereich der Fibroblasten führte die singuläre Stimulation mit BMP7 bei den mit 100ng/ml stimulierten Proben zu einer um das 1,018-fache (Tag drei), 1,048-fache (Tag sieben) und 1,023-fache (Tag zehn) gesteigerten, relativen Expression. Diese Änderungen der Expression waren im Vergleich zu den anderen Proben zum gleichen Zeitpunkt signifikant. Bei den anderen Proben war eine dosis- bzw. zeitunabhängige Reduktion der relativen Expression zu beobachten. Hiervon war jedoch nur die Expressionsänderungen im Vergleich zu den mit 100ng/ml stimulierten Proben signifikant.

Zusammenfassend betrachtet hat die singuläre Stimulation mit BMP7 bei den mit 100ng/ml stimulierten Proben einen expressionssteigernden Effekt. Dieser ist in allen Bereichen und zu jedem Zeitpunkt auszumachen. Bei den mit 250ng/ml und 500ng/ml stimulierten Proben sind reduzierte Expressionswerte, in allen Bereichen unabhängig vom Zeitpunkt zu finden. (Siehe Abbildungen 12, 13 und 14 sowie Tabelle 14)

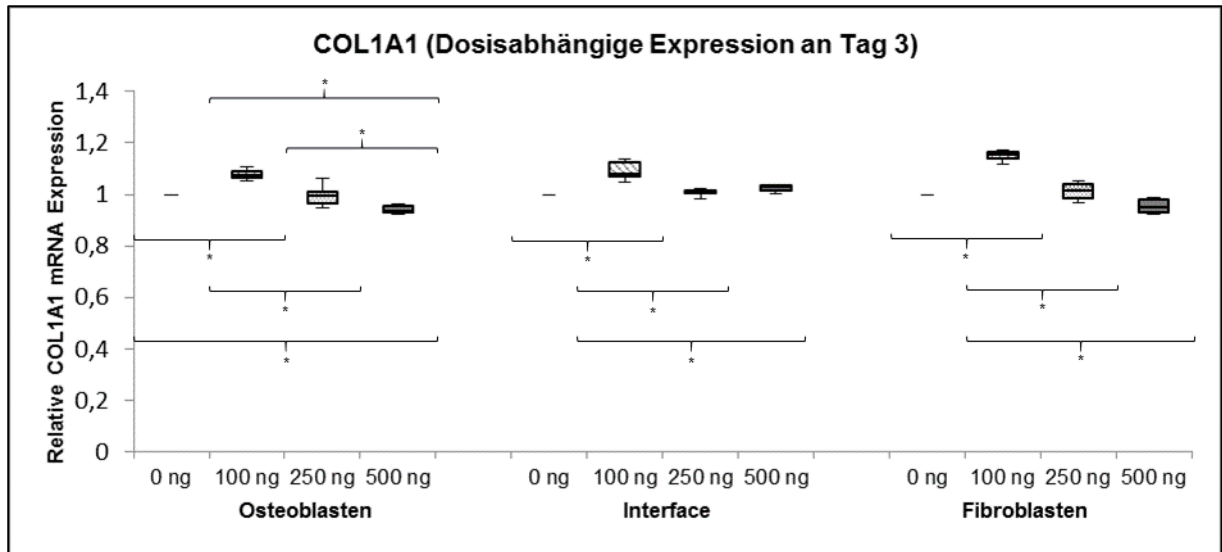


Abbildung 13: Graphische Darstellung der Expression von COL1A1 nach drei Tagen singulärer Stimulation mit BMP7

Mittlerer Querstrich: Median

Oberer und unterer Querstrich: Minimum und Maximum

Obere und untere Begrenzung des Kastens: 25. und 75. Perzentile

* Die Änderung der Expression zwischen diesen Proben ist signifikant ($p < 0,05$)

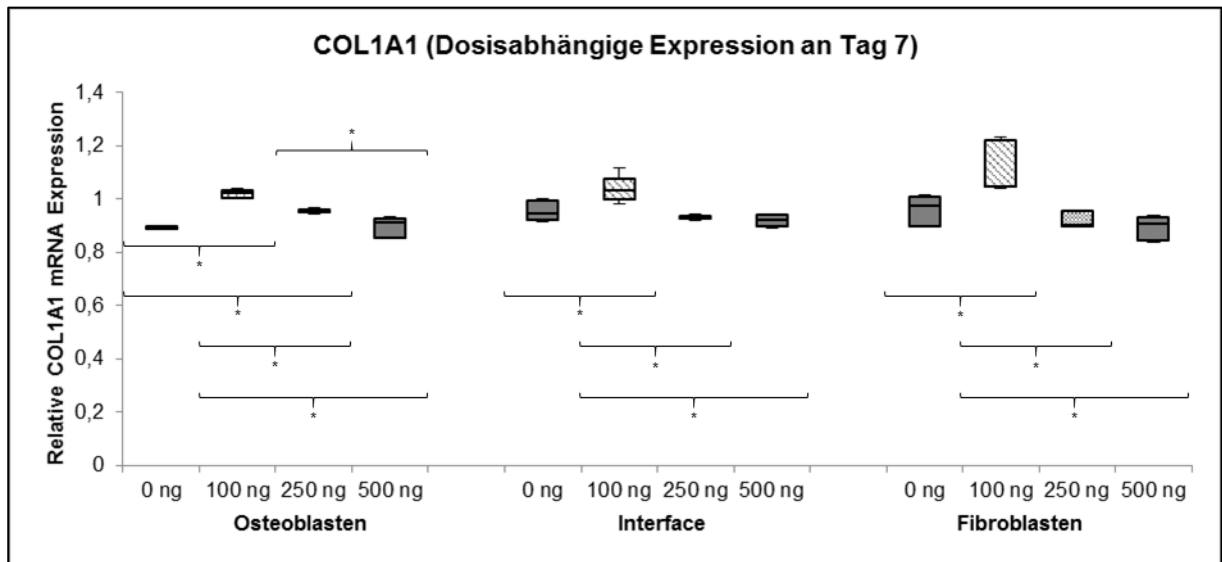


Abbildung 14: Graphische Darstellung der Expression von COL1A1 nach sieben Tagen singulärer Stimulation mit BMP7

Mittlerer Querstrich: Median

Oberer und unterer Querstrich: Minimum und Maximum

Obere und untere Begrenzung des Kastens: 25. und 75. Perzentile

* Die Änderung der Expression zwischen diesen Proben ist signifikant ($p < 0,05$)

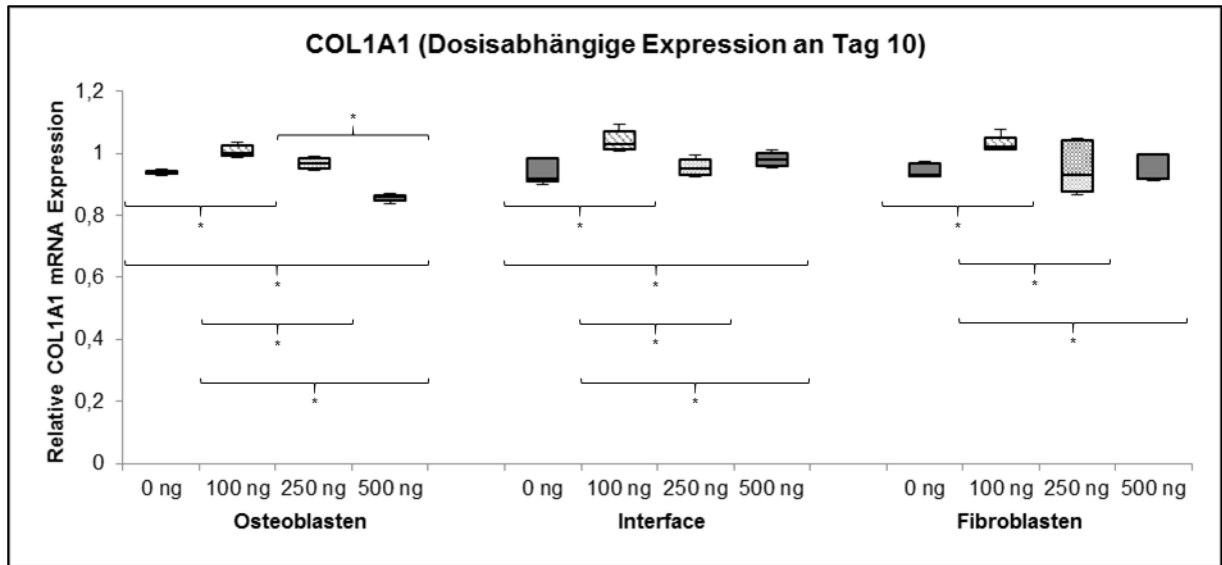


Abbildung 15: Graphische Darstellung der Expression von COL1A1 nach zehn Tagen singularer Stimulation mit BMP7

Mittlerer Querstrich: Median

Oberer und unterer Querstrich: Minimum und Maximum

Obere und untere Begrenzung des Kastens: 25. und 75. Perzentile

* Die Änderung der Expression zwischen diesen Proben ist signifikant ($p < 0,05$)

Tabelle 14: Relative Expression von COL1A1 nach singulärer Stimulation mit BMP7

RE COL1A1 nach singulärer Stimulation mit BMP7 an Tag 3			
	Präosteoblasten	Intermediärzone	Fibroblasten
0ng/ml			
100ng/ml	1,073	1,079	1,157
250ng/ml	0,993	1,008	1,018
500ng/ml	0,938	1,031	0,951
RE COL1A1 nach singulärer Stimulation mit BMP7 an Tag 7			
	Präosteoblasten	Intermediärzone	Fibroblasten
0ng/ml	0,890	0,944	0,974
100ng/ml	1,024	1,030	1,048
250ng/ml	0,954	0,932	0,901
500ng/ml	0,913	0,920	0,906
RE COL1A1 nach singulärer Stimulation mit BMP7 an Tag 10			
	Präosteoblasten	Intermediärzone	Fibroblasten
0ng/ml	0,940	0,917	0,930
100ng/ml	1,000	1,028	1,023
250ng/ml	0,968	0,950	0,931
500ng/ml	0,858	0,978	0,919

4.1.4. Multiple Stimulation mit BMP7

Die relative Expression von COL1A1 war im Bereich der Präosteoblasten nach multipler Stimulation mit BMP7 an Tag sieben um das 1,01-fache bei den nicht stimulierten Proben bzw. das 1,05-fache bei den mit 100ng/ml stimulierten und an Tag zehn um das 1,048-fache bei den nicht stimulierten bzw. 1,015-fache bei den mit 100ng/ml stimulierten gesteigert. Diese Expressionsänderungen waren zwischen den genannten Proben signifikant. Die anderen stimulierten Proben zeigten zu jedem Zeitpunkt eine reduzierte Expression. An Tag drei und zehn waren diese im Vergleich zu den nicht stimulierten Proben signifikant.

In der Intermediärzone zeigten die stimulierten Proben an Tag sieben und zehn gesteigerte Expressionswerte, wobei diese im Vergleich zu den nicht stimulierten Proben am gleichen Tag niedriger waren. An Tag drei zeigten die stimulierten Proben eine reduzierte Expression. Es lag zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Expressionsänderung zwischen den Proben vor.

Im Bereich der Fibroblasten zeigten die stimulierten Proben an Tag drei und sieben reduzierte Expressionswerte. An Tag zehn zeigten die mit 500ng/ml stimulierten Proben einen 1,093-fachen Anstieg der relativen Expression. Dieser war im Vergleich zu den nicht stimulierten Proben zum gleichen Zeitpunkt signifikant.

Es zeigen sich signifikante Expressionsanstiege bei den mit 100ng/ml stimulierten Proben an Tag sieben im Bereich der Osteoblasten und den mit 500ng/ml stimulierten an Tag zehn im Bereich der Fibroblasten. Insgesamt zeigte sich nach multipler Stimulation mit BMP7 aber eine reduzierte, relativen Expression von COL1A1 in den stimulierten Proben aller Bereiche. (Siehe Abbildungen 15, 16 und 17 sowie Tabelle 15)

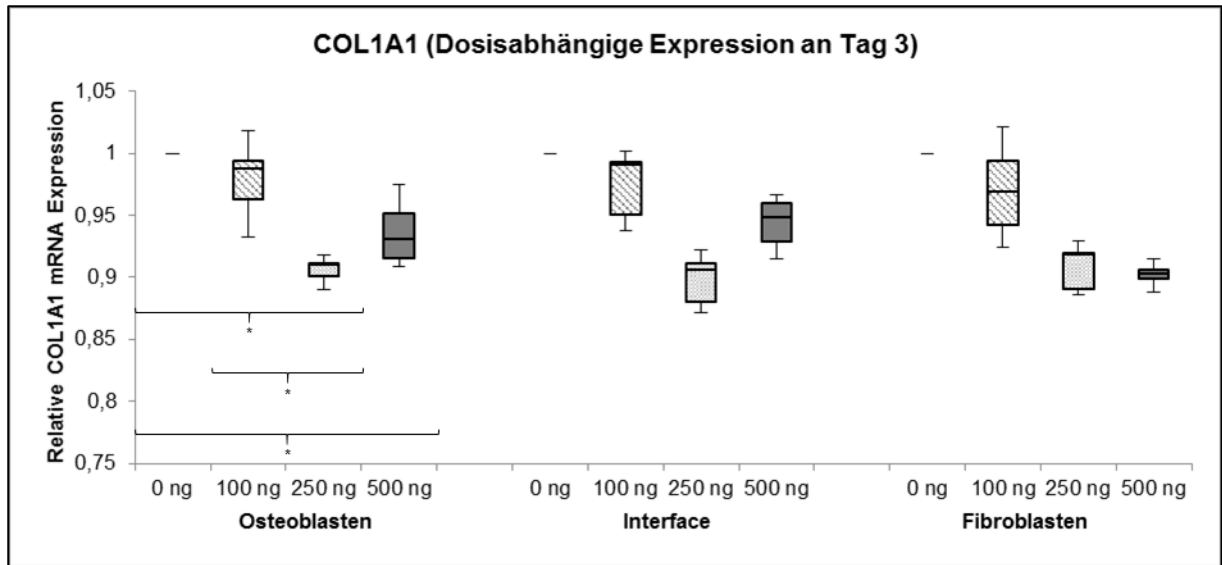


Abbildung 16: Graphische Darstellung der Expression von COL1A1 nach drei Tagen multipler Stimulation mit BMP7

Mittlerer Querstrich: Median

Oberer und unterer Querstrich: Minimum und Maximum

Obere und untere Begrenzung des Kastens: 25. und 75. Perzentile

* Die Änderung der Expression zwischen diesen Proben ist signifikant ($p < 0,05$)

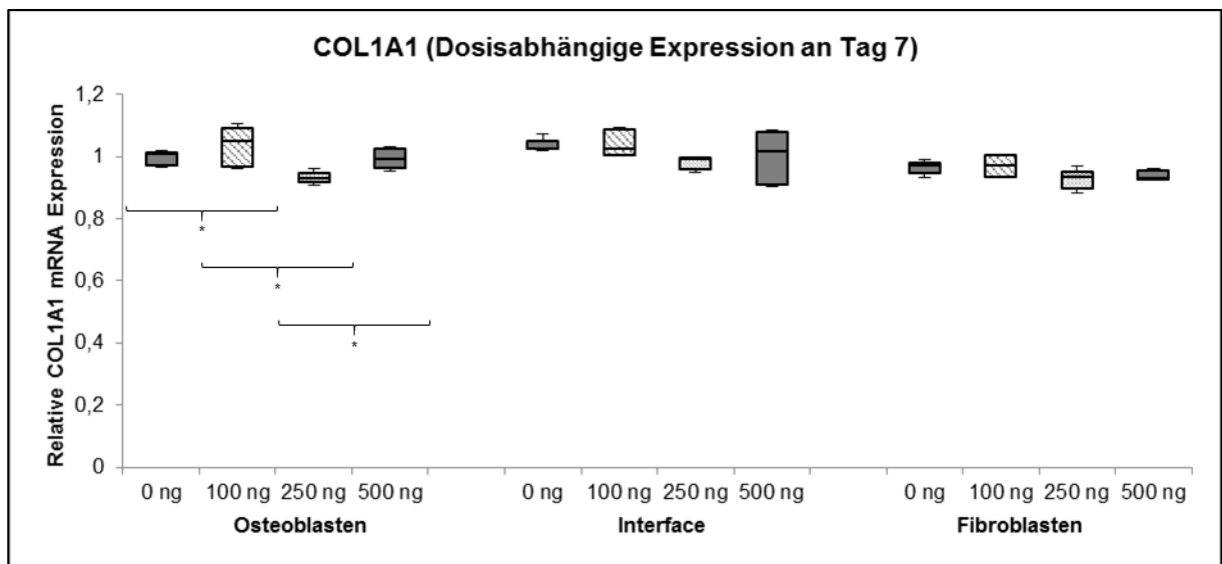


Abbildung 17: Graphische Darstellung der Expression von COL1A1 nach sieben Tagen multipler Stimulation mit BMP7

Mittlerer Querstrich: Median

Oberer und unterer Querstrich: Minimum und Maximum

Obere und untere Begrenzung des Kastens: 25. und 75. Perzentile

* Die Änderung der Expression zwischen diesen Proben ist signifikant ($p < 0,05$)

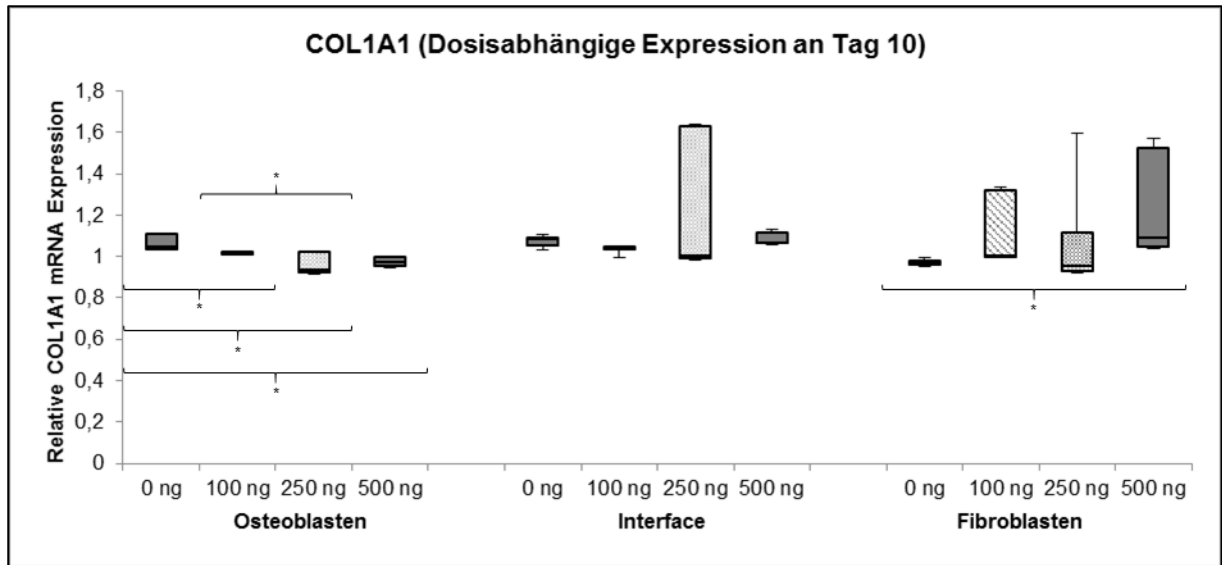


Abbildung 18: Graphische Darstellung der Expression von COL1A1 nach zehn Tagen multipler Stimulation mit BMP7

Mittlerer Querstrich: Median

Oberer und unterer Querstrich: Minimum und Maximum

Obere und untere Begrenzung des Kastens: 25. und 75. Perzentile

* Die Änderung der Expression zwischen diesen Proben ist signifikant ($p < 0,05$)

Tabelle 15: Relative Expression von COL1A1 nach multipler Stimulation mit BMP7

RE COL1A1 nach multipler Stimulation mit BMP7 an Tag 3			
	Präosteoblasten	Intermediärzone	Fibroblasten
0ng/ml			
100ng/ml	0,987	0,991	0,969
250ng/ml	0,910	0,906	0,918
500ng/ml	0,930	0,948	0,903
RE COL1A1 nach multipler Stimulation mit BMP7 an Tag 7			
	Präosteoblasten	Intermediärzone	Fibroblasten
0ng/ml	1,010	1,025	0,973
100ng/ml	1,050	1,024	0,972
250ng/ml	0,930	0,991	0,935
500ng/ml	0,992	1,015	0,929
RE COL1A1 nach multipler Stimulation mit BMP7 an Tag 10			
	Präosteoblasten	Intermediärzone	Fibroblasten
0ng/ml	1,048	1,085	0,973
100ng/ml	1,015	1,041	1,004
250ng/ml	0,936	1,006	0,953
500ng/ml	0,976	1,068	1,093

4.2. Expression von COL1A2

4.2.1. Singuläre Stimulation mit BMP2

Im Bereich der Präosteoblasten zeigte die Expression von COL1A2 ähnliche Expressionsänderungen wie die von COL1A1 unter singulärer Stimulation mit BMP2. (Vergleiche Kapitel 4.1.1)

In den stimulierten Proben zeigte sich eine dosis- und zeitpunktunabhängige, reduzierte relative Expression von COL1A2. Bei den nicht stimulierten Proben kam es zu einem 1,154-fachen Anstieg dieser an Tag sieben und einem 1,209-fachen Anstieg an Tag zehn. Auch hier waren die Änderungen der Expression zwischen stimulierten und nicht stimulierten Proben zu jedem Zeitpunkt signifikant.

In der Intermediärzone zeigten alle stimulierten Proben einen zeitpunktunabhängigen Anstieg der relativen Expression. Besonders deutlich war dieser nach drei und sieben Tagen bei den mit 500ng/ml stimulierten Proben. Hier zeigte sich an Tag drei ein 1,273-facher und an Tag 7 ein 1,312-facher Anstieg dieser. Zu beiden Zeitpunkten war die Expressionsänderung der mit 500ng/ml stimulierten Proben im Vergleich zu den nicht stimulierten Proben signifikant.

Die Proben aus dem Bereich der Fibroblasten zeigten hinsichtlich der relativen Expression von COL1A2 ebenfalls ein ähnliches Muster wie bei der Expression von COL1A1. (Vergleiche Kapitel 4.1.1)

Es kam zu einem Anstieg dieser in allen Proben, wobei zu jedem Zeitpunkt die Expression der stimulierten über der der nicht stimulierten Proben lag. Bei den mit 100ng/ml bzw. 250ng/ml stimulierten Proben zeigte sich ein deutlicher, 1,201-facher bzw. 1,326-facher Anstieg der relativen Expression an Tag 10. Diese Änderungen der Expression waren zum genannten Zeitpunkt jeweils zu den nicht stimulierten und den mit 500ng/ml stimulierten Proben signifikant.

Zusammenfassend wirkt die singuläre Stimulation mit BMP2 hemmend auf die Expression von COL1A2 durch Präosteoblasten, bewirkt aber eine Steigerung

dieser in der Intermediärzone und in den Fibroblasten. (Siehe Abbildungen 18,19 und 20 sowie Tabelle 16)

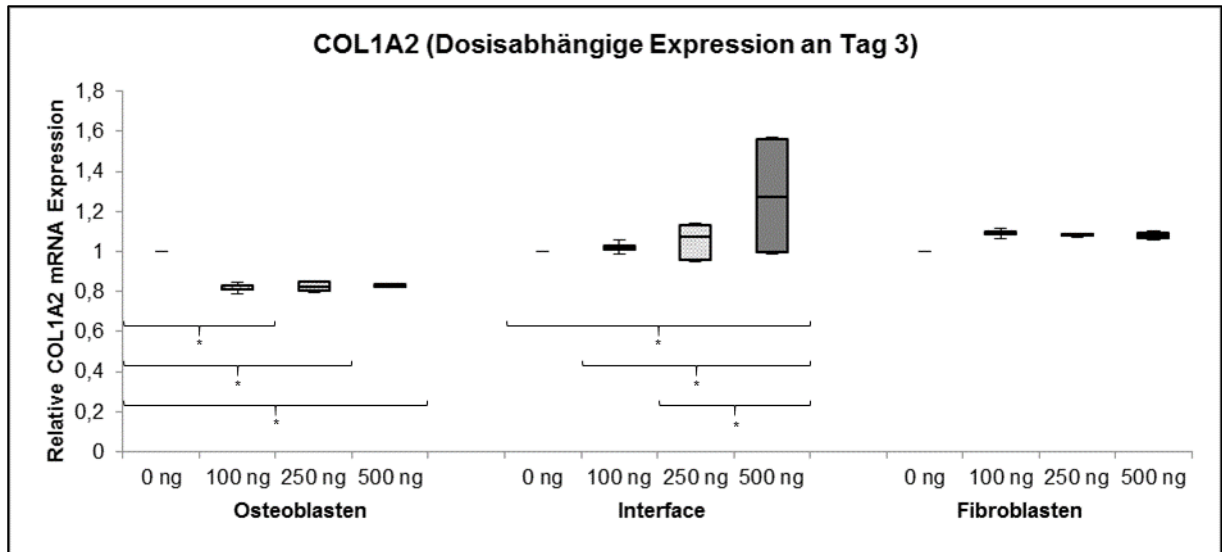


Abbildung 19: Graphische Darstellung der Expression von COL1A2 nach drei Tagen singulärer Stimulation mit BMP2

Mittlerer Querstrich: Median

Oberer und unterer Querstrich: Minimum und Maximum

Obere und untere Begrenzung des Kastens: 25. und 75. Perzentile

* Die Änderung der Expression zwischen diesen Proben ist signifikant ($p < 0,05$)

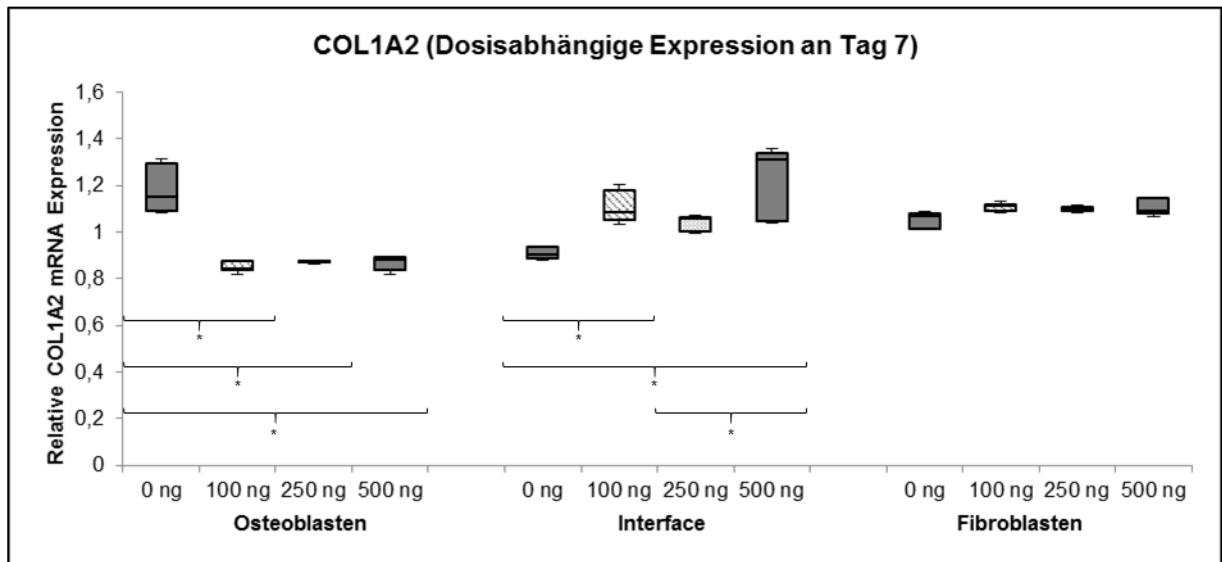


Abbildung 20: Graphische Darstellung der Expression von COL1A2 nach sieben Tagen singulärer Stimulation mit BMP2

Mittlerer Querstrich: Median

Oberer und unterer Querstrich: Minimum und Maximum

Obere und untere Begrenzung des Kastens: 25. und 75. Perzentile

* Die Änderung der Expression zwischen diesen Proben ist signifikant ($p < 0,05$)

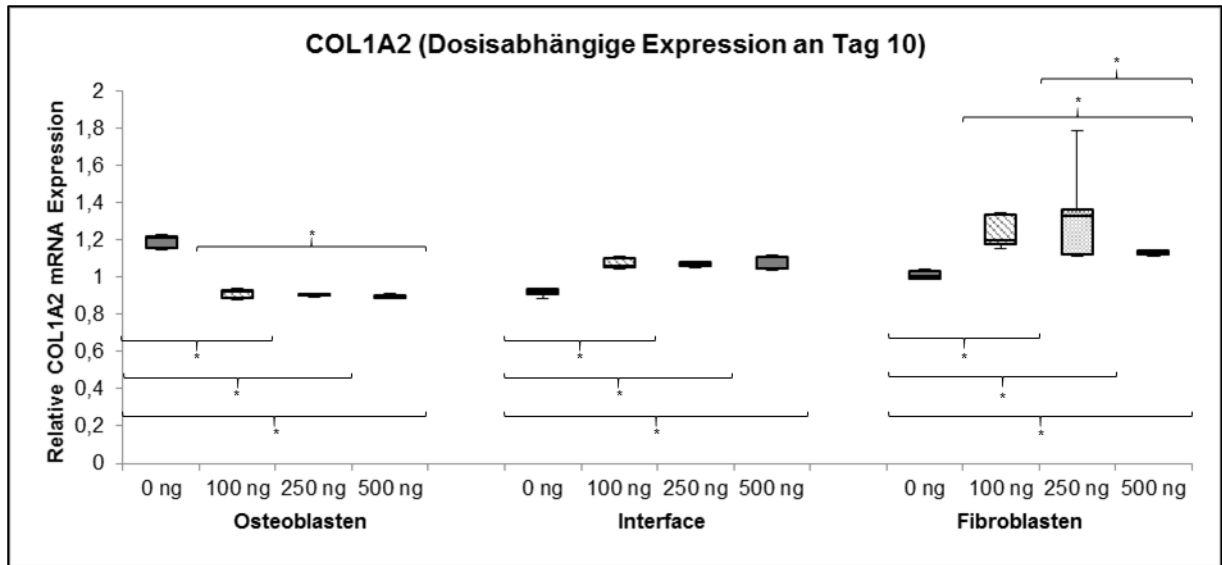


Abbildung 21: Graphische Darstellung der Expression von COL1A2 nach zehn Tagen singulärer Stimulation mit BMP2

Mittlerer Querstrich: Median

Oberer und unterer Querstrich: Minimum und Maximum

Obere und untere Begrenzung des Kastens: 25. und 75. Perzentile

* Die Änderung der Expression zwischen diesen Proben ist signifikant ($p < 0,05$)

Tabelle 16: Relative Expression von COL1A2 nach singulärer Stimulation mit BMP2

RE COL1A2 nach singulärer Stimulation mit BMP2 an Tag 3			
	Präosteoblasten	Intermediärzone	Fibroblasten
0ng/ml			
100ng/ml	0,813	1,016	1,093
250ng/ml	0,825	1,074	1,079
500ng/ml	0,827	1,273	1,081
RE COL1A2 nach singulärer Stimulation mit BMP2 an Tag 7			
	Präosteoblasten	Intermediärzone	Fibroblasten
0ng/ml	1,154	0,904	1,069
100ng/ml	0,846	1,083	1,110
250ng/ml	0,870	1,059	1,103
500ng/ml	0,884	1,312	1,089
RE COL1A2 nach singulärer Stimulation mit BMP2 an Tag 10			
	Präosteoblasten	Intermediärzone	Fibroblasten
0ng/ml	1,209	0,922	1,008
100ng/ml	0,920	1,061	1,201
250ng/ml	0,904	1,075	1,326
500ng/ml	0,893	1,050	1,128

4.2.2. Multiple Stimulation mit BMP2

Im Bereich der Präosteoblasten zeigte sich in den stimulierten Proben, unabhängig von Dosis und Zeitpunkt, eine reduzierte relative Expression bzw. im Vergleich zu den nicht stimulierten Proben einen geringeren Anstieg dieser. An Tag sieben war ein deutlicher, 1,468-facher Anstieg der relativen Expression der nicht stimulierten Proben auszumachen. Dieser war im Vergleich zu den anderen Proben zum genannten Zeitpunkt signifikant.

In der Intermediärzone zeigten an Tag sieben die mit 100ng/ml und 500ng/ml stimulierten Proben einen signifikanten, 1,281-fachen bzw. 1,586-fachen Anstieg der relativen Expression im Vergleich zu den nicht stimulierten Proben. Ansonsten war in den anderen, stimulierten Proben zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Expressionsanstieg auszumachen.

Die Expression von COL1A2 im Bereich der Fibroblasten zeigte nach multipler Stimulation mit BMP2 keinerlei signifikante Expressionsänderungen. Die stimulierten Proben zeigten im Vergleich zu den nicht stimulierten eine reduzierte relative Expression oder einen geringeren Anstieg dieser.

Zusammenfassend betrachtet bestand nach multipler Stimulation mit BMP2 hinsichtlich der Expression von COL1A2 ein ähnliches Expressionsmuster wie bei der von COL1A1. Es zeigten sich auch hier vereinzelt signifikante Anstiege der relativen Expression. (Siehe Abbildungen 21, 22 und 23 sowie Tabelle 17) (Vergleiche Kapitel 4.1.2)

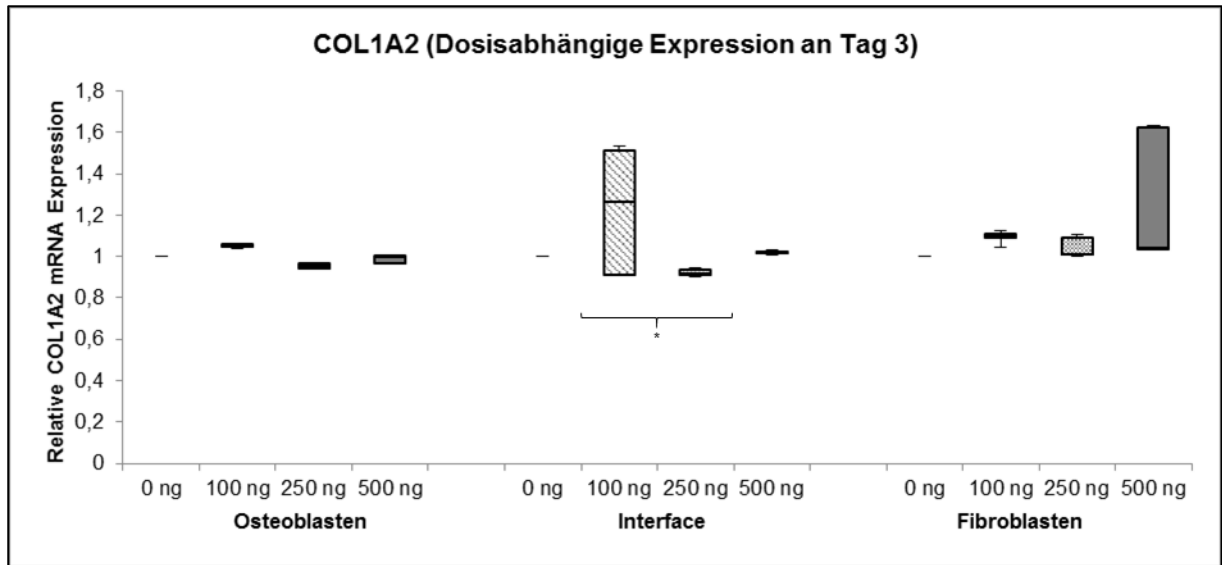


Abbildung 22: Graphische Darstellung der Expression von COL1A2 nach drei Tagen multipler Stimulation mit BMP2

Mittlerer Querstrich: Median

Oberer und unterer Querstrich: Minimum und Maximum

Obere und untere Begrenzung des Kastens: 25. und 75. Perzentile

* Die Änderung der Expression zwischen diesen Proben ist signifikant ($p < 0,05$)

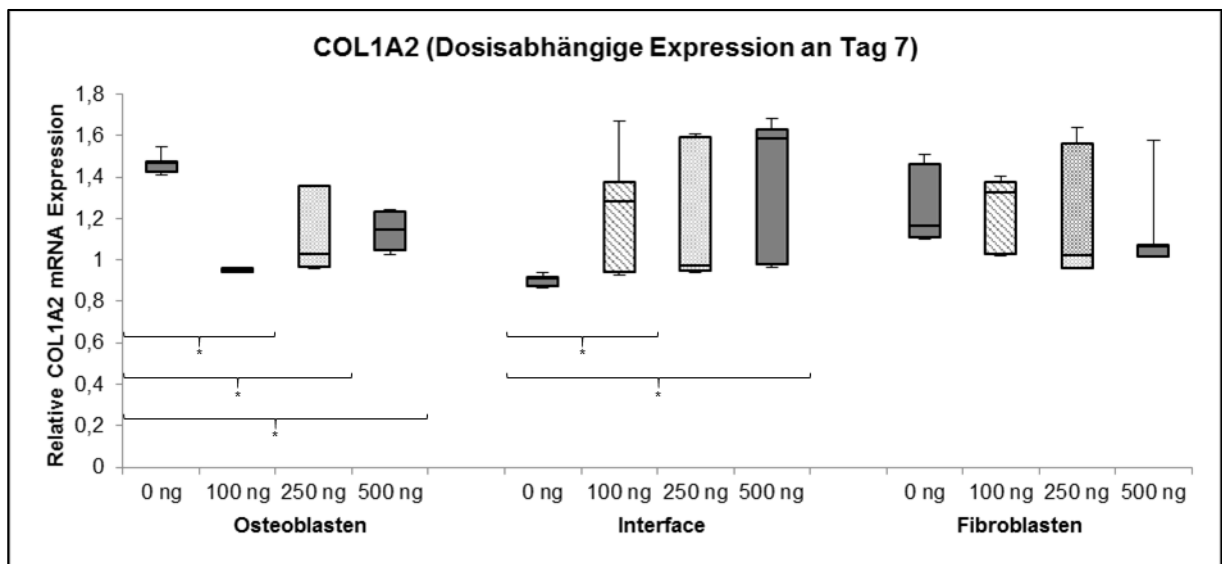


Abbildung 23: Graphische Darstellung der Expression von COL1A2 nach sieben Tagen multipler Stimulation mit BMP2

Mittlerer Querstrich: Median

Oberer und unterer Querstrich: Minimum und Maximum

Obere und untere Begrenzung des Kastens: 25. und 75. Perzentile

* Die Änderung der Expression zwischen diesen Proben ist signifikant ($p < 0,05$)

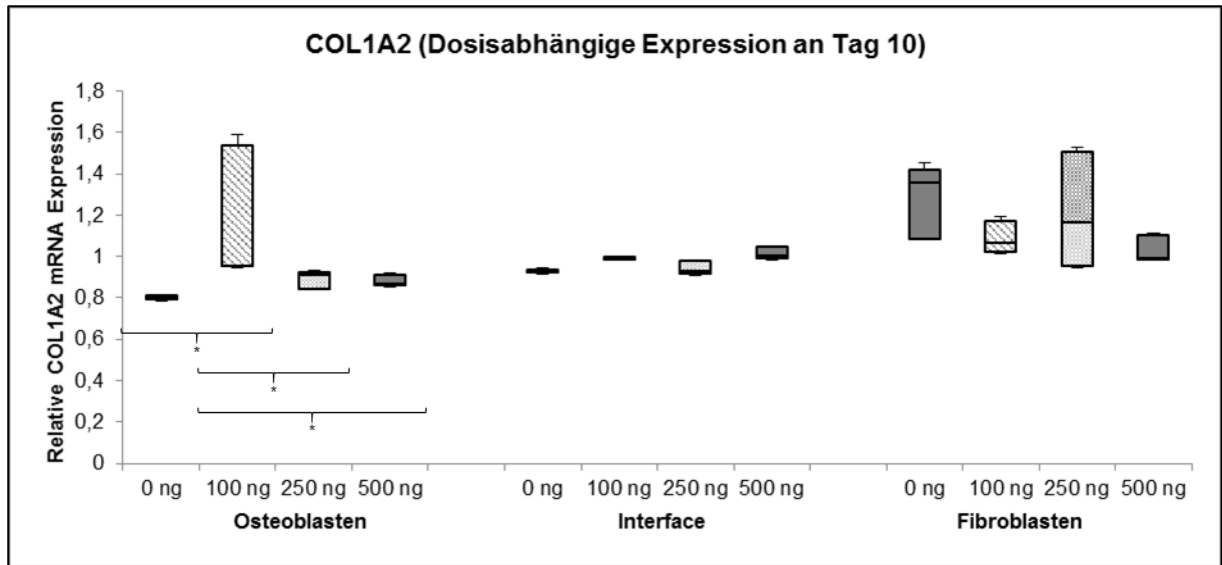


Abbildung 24: Graphische Darstellung der Expression von COL1A2 nach zehn Tagen multipler Stimulation mit BMP2

Mittlerer Querstrich: Median

Oberer und unterer Querstrich: Minimum und Maximum

Obere und untere Begrenzung des Kastens: 25. und 75. Perzentile

* Die Änderung der Expression zwischen diesen Proben ist signifikant ($p < 0,05$)

Tabelle 17: Relative Expression von COL1A2 nach multipler Stimulation mit BMP2

RE COL1A2 nach multipler Stimulation mit BMP2 an Tag 3			
	Präosteoblasten	Intermediärzone	Fibroblasten
0ng/ml			
100ng/ml	1,051	1,265	1,100
250ng/ml	0,957	0,916	1,012
500ng/ml	0,996	1,018	1,043
RE COL1A2 nach multipler Stimulation mit BMP2 an Tag 7			
	Präosteoblasten	Intermediärzone	Fibroblasten
0ng/ml	1,468	0,911	1,165
100ng/ml	0,948	1,281	1,327
250ng/ml	1,026	0,974	1,025
500ng/ml	1,144	1,586	1,069
RE COL1A2 nach multipler Stimulation mit BMP2 an Tag 10			
	Präosteoblasten	Intermediärzone	Fibroblasten
0ng/ml	0,798	0,931	1,358
100ng/ml	0,954	0,994	1,068
250ng/ml	0,911	0,933	1,164
500ng/ml	0,866	1,003	0,992

4.2.3. Singuläre Stimulation mit BMP7

Im Bereich der Präosteoblasten war die relative Expression von COL1A2 nach singulärer Stimulation mit BMP7 zu jedem Zeitpunkt, sowohl in den stimulierten als auch den nicht stimulierten Proben reduziert. An Tag sieben waren hierbei die Expressionsänderungen aller stimulierten Proben im Vergleich zu den nicht stimulierten signifikant. An Tag 10 zeigten die mit 500ng/ml stimulierten Proben eine deutliche 0,880-fache Reduktion der relativen Expression. Diese Expressionsänderung war im Vergleich zu den anderen Proben zum genannten Zeitpunkt signifikant.

In der Intermediärzone zeigten sich bei allen stimulierten und nicht stimulierten Proben reduzierte Expressionswerte. Lediglich die Expressionsänderung der mit 500ng/ml stimulierten Proben im Vergleich zu den nicht stimulierten Proben war an Tag 10 signifikant.

Die mit 100ng/ml stimulierten Proben zeigten im Bereich der Fibroblasten an Tag drei und sieben eine 1,157-fache bzw. 1,048-fache Steigerungen der relativen Expression. Diese Änderung der Expression war im Vergleich zu den anderen stimulierten Proben signifikant. An Tag zehn war die relative Expression bei den mit 100ng/ml stimulierten Proben reduziert.

Zusammenfassend zeigt sich, dass die singuläre Stimulation mit BMP7 hemmend auf die COL1A2 Expression im Bereich der Präosteoblasten und in der Intermediärzone wirkt. Im Bereich der Fibroblasten war intermittierend eine expressionssteigernde Wirkung nach Stimulation mit 100ng/ml auszumachen. (Siehe Abbildungen 24, 25 und 26 sowie Tabelle 18)

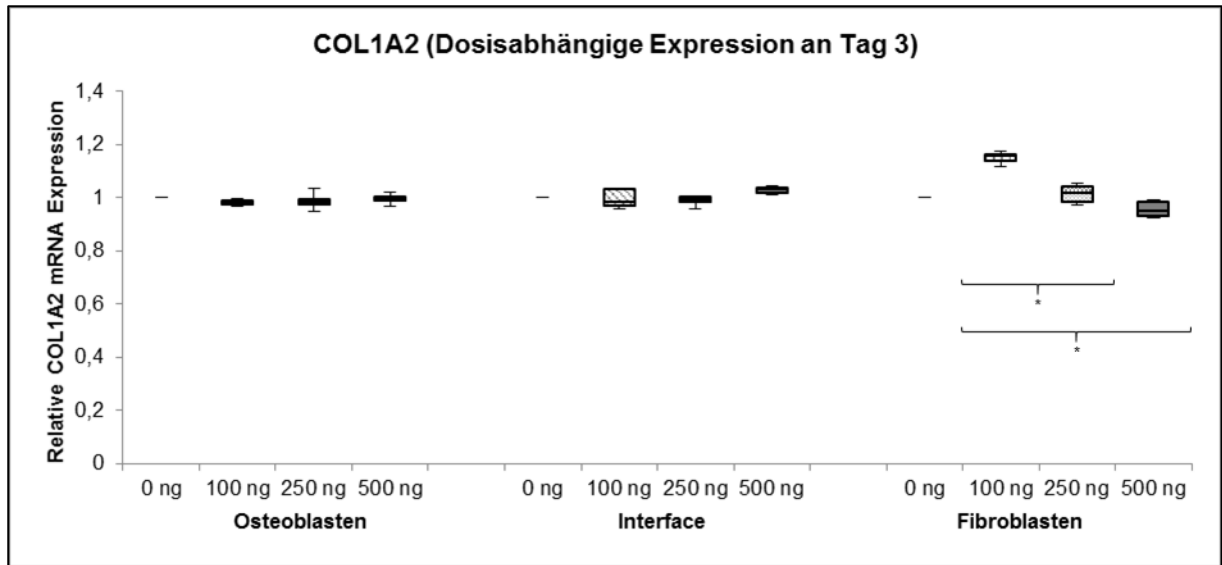


Abbildung 25: Graphische Darstellung der Expression von COL1A2 nach drei Tagen singulärer Stimulation mit BMP7

Mittlerer Querstrich: Median

Oberer und unterer Querstrich: Minimum und Maximum

Obere und untere Begrenzung des Kastens: 25. und 75. Perzentile

* Die Änderung der Expression zwischen diesen Proben ist signifikant ($p < 0,05$)

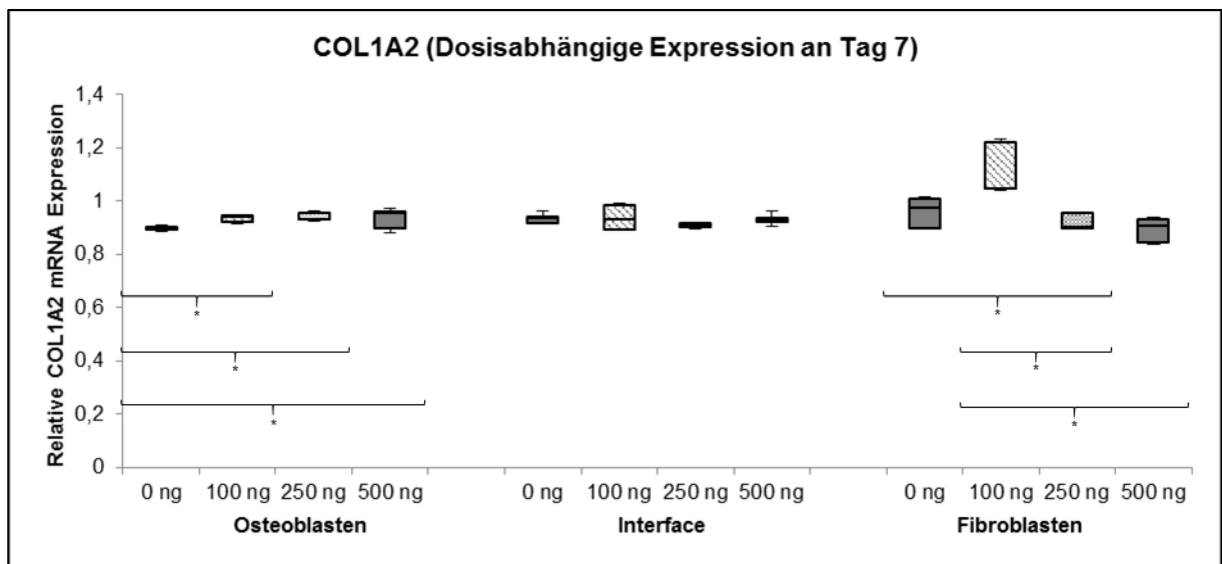


Abbildung 26: Graphische Darstellung der Expression von COL1A2 nach sieben Tagen singulärer Stimulation mit BMP7

Mittlerer Querstrich: Median

Oberer und unterer Querstrich: Minimum und Maximum

Obere und untere Begrenzung des Kastens: 25. und 75. Perzentile

* Die Änderung der Expression zwischen diesen Proben ist signifikant ($p < 0,05$)



Abbildung 27: Graphische Darstellung der Expression von COL1A2 nach zehn Tagen singularer Stimulation mit BMP7

Mittlerer Querstrich: Median

Oberer und unterer Querstrich: Minimum und Maximum

Obere und untere Begrenzung des Kastens: 25. und 75. Perzentile

* Die Änderung der Expression zwischen diesen Proben ist signifikant ($p < 0,05$)

Tabelle 18: Relative Expression von COL1A2 nach singulärer Stimulation mit BMP7

RE COL1A2 nach singulärer Stimulation mit BMP7 an Tag 3			
	Präosteoblasten	Intermediärzone	Fibroblasten
0ng/ml			
100ng/ml	0,982	0,984	1,157
250ng/ml	0,986	0,993	1,018
500ng/ml	0,998	1,030	0,951
RE COL1A2 nach singulärer Stimulation mit BMP7 an Tag 7			
	Präosteoblasten	Intermediärzone	Fibroblasten
0ng/ml	0,896	0,934	0,974
100ng/ml	0,940	0,930	1,048
250ng/ml	0,932	0,911	0,901
500ng/ml	0,955	0,925	0,906
RE COL1A2 nach singulärer Stimulation mit BMP7 an Tag 10			
	Präosteoblasten	Intermediärzone	Fibroblasten
0ng/ml	0,944	0,896	0,930
100ng/ml	0,907	0,907	1,023
250ng/ml	0,953	0,911	0,931
500ng/ml	0,880	0,958	0,919

4.2.4. Multiple Stimulation mit BMP7

Im Bereich der Präosteoblasten zeigte sich nach multipler Stimulation mit BMP7 in allen Proben ein Anstieg der relativen Expression von COL1A2. Dieser war in den stimulierten Proben höher als in den nicht stimulierten Proben zum entsprechenden Zeitpunkt. Insbesondere bei den mit 100ng/ml stimulierten Proben an Tag 7 kam es zu einem deutlichen, 1,205-fachen Anstieg der relativen Expression. Mit Ausnahme der mit 500ng/ml stimulierten Proben an Tag zehn, waren alle weiteren Expressionsänderungen zwischen stimulierten und nicht stimulierten Proben zu jedem Zeitpunkt signifikant.

In der Intermediärzone zeigte sich das gleiche Expressionsverhalten mit Anstieg der relativen Expression in allen Proben. Auch hier war dieser in den stimulierten Proben höher als in den nicht stimulierten Proben zum entsprechenden Zeitpunkt. Bei den mit 100ng/ml stimulierten Proben an Tag sieben und den mit 500ng/ml stimulierten an Tag sieben und zehn kam es zu einem 1,123-fachen bzw. 1,107-fachen und 1,236-fachen Expressionsanstieg. Diese Änderungen waren im Vergleich zu den nicht stimulierten Proben am genannten Zeitpunkt signifikant.

Im Bereich der Fibroblasten zeigten ebenfalls alle stimulierten Proben eine gesteigerte relative Expression. Bei den nicht stimulierten Proben kam es zeitpunktunabhängig zu einer Abnahme dieser. An Tag zehn zeigten die mit 100ng/ml und 500ng/ml stimulierten Proben einen 1,136-fachen bzw. 1,232-fachen Expressionsanstieg. Diese Änderungen waren ebenfalls im Vergleich zu den nicht stimulierten Proben am genannten Zeitpunkt signifikant.

Die multiple Stimulation mit BMP7 hat auf die Expression von COL1A2 eine steigernde Wirkung im Bereich der Präosteoblasten, Fibroblasten und in der Intermediärzone. (Siehe Abbildungen 27, 28 und 29 sowie Tabelle 19)

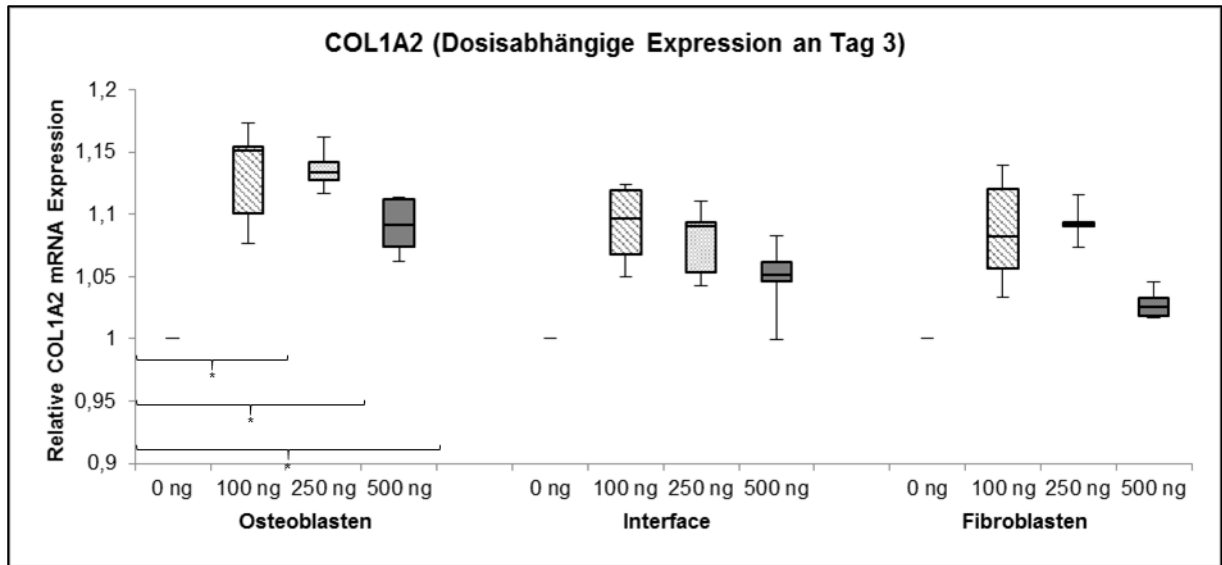


Abbildung 28: Graphische Darstellung der Expression von COL1A2 nach drei Tagen multipler Stimulation mit BMP7

Mittlerer Querstrich: Median

Oberer und unterer Querstrich: Minimum und Maximum

Obere und untere Begrenzung des Kastens: 25. und 75. Perzentile

* Die Änderung der Expression zwischen diesen Proben ist signifikant ($p < 0,05$)

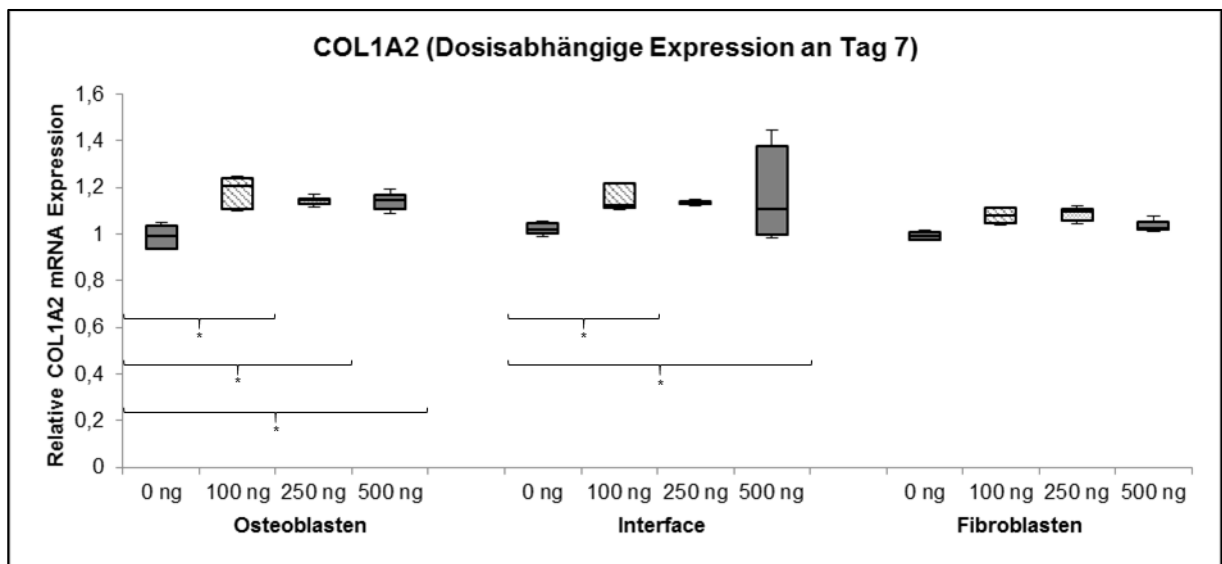


Abbildung 29: Graphische Darstellung der Expression von COL1A2 nach sieben Tagen multipler Stimulation mit BMP7

Mittlerer Querstrich: Median

Oberer und unterer Querstrich: Minimum und Maximum

Obere und untere Begrenzung des Kastens: 25. und 75. Perzentile

* Die Änderung der Expression zwischen diesen Proben ist signifikant ($p < 0,05$)

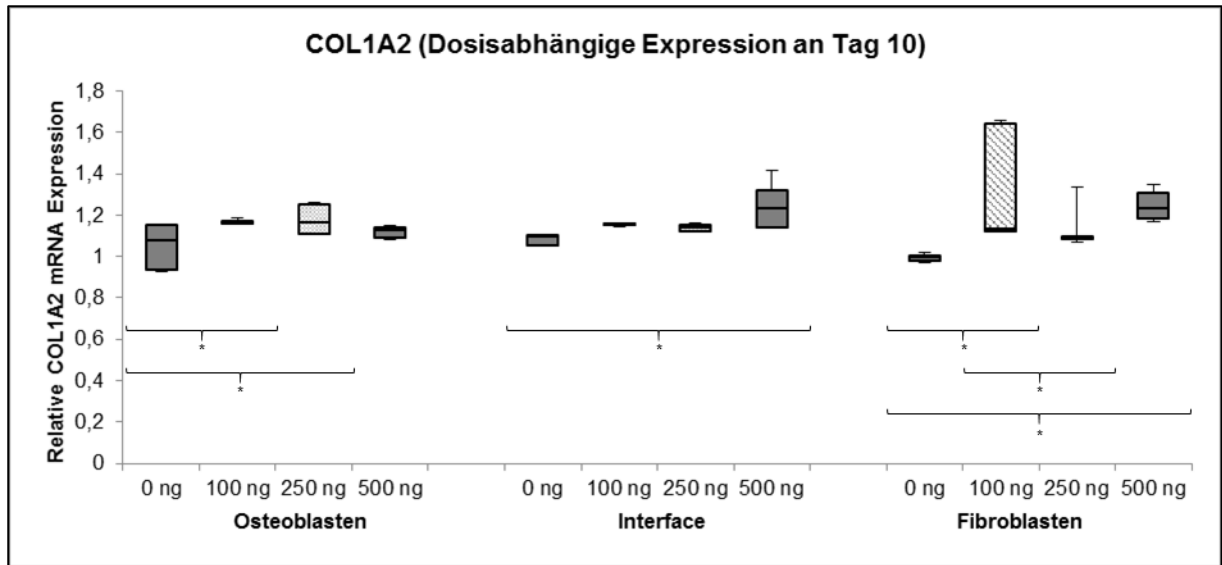


Abbildung 30: Graphische Darstellung der Expression von COL1A2 nach zehn Tagen multipler Stimulation mit BMP7

Mittlerer Querstrich: Median

Oberer und unterer Querstrich: Minimum und Maximum

Obere und untere Begrenzung des Kastens: 25. und 75. Perzentile

* Die Änderung der Expression zwischen diesen Proben ist signifikant ($p < 0,05$)

Tabelle 19: Relative Expression von COL1A2 nach multipler Stimulation mit BMP7

RE COL1A2 nach multipler Stimulation mit BMP7 an Tag 3			
	Präosteoblasten	Intermediärzone	Fibroblasten
0ng/ml			
100ng/ml	1,151	1,097	1,083
250ng/ml	1,134	1,091	1,092
500ng/ml	1,092	1,051	1,026
RE COL1A2 nach multipler Stimulation mit BMP7 an Tag 7			
	Präosteoblasten	Intermediärzone	Fibroblasten
0ng/ml	0,990	1,020	0,992
100ng/ml	1,205	1,123	1,081
250ng/ml	1,145	1,134	1,098
500ng/ml	1,146	1,107	1,026
RE COL1A2 nach multipler Stimulation mit BMP7 an Tag 10			
	Präosteoblasten	Intermediärzone	Fibroblasten
0ng/ml	1,081	1,095	0,996
100ng/ml	1,167	1,152	1,136
250ng/ml	1,164	1,140	1,089
500ng/ml	1,127	1,236	1,232

4.3. Expression von COL5A1

4.3.1. Singuläre Stimulation mit BMP2

Es zeigte sich in den nicht stimulierten Proben im Bereich der Präosteoblasten an Tag sieben und zehn ein 1,222-facher bzw. 1,041-facher Anstieg der relativen Expression von COL5A1. An Tag sieben war diese Expressionsänderung im Vergleich zu allen stimulierten Proben, an Tag zehn im Vergleich zu den mit 100ng/ml und 250ng/ml stimulierten signifikant. Die mit 250ng/ml und 500ng/ml stimulierten Proben zeigten zu jedem Zeitpunkt eine gesteigerte Expression, die mit 100ng/ml stimulierten an Tag zehn. Die Expressionssteigerung war jedoch geringer als in den nicht stimulierten Proben zum entsprechenden Zeitpunkt.

In der Intermediärzone zeigten die mit 500ng/ml stimulierten Proben an Tag drei einen 1,212-fachen Anstieg der relativen Expression. Dieser Expressionsanstieg war im Vergleich zu den anderen Proben an Tag drei signifikant. Abgesehen hiervon zeigten alle Proben dosis- und zeitpunktunabhängig eine reduzierte relative Expression ohne signifikante Änderungen dieser untereinander.

Im Bereich der Fibroblasten zeigten die mit 250ng/ml stimulierten Proben an Tag zehn einen 1,17-fachen, im Vergleich zu den nicht stimulierten Proben signifikanten Anstieg der relativen Expression. Die weiteren stimulierten Proben zeigten an Tag drei und zehn gesteigerte Expressionen. An Tag sieben war lediglich bei den mit 500ng/ml stimulierten Proben ein Anstieg der Expression auszumachen. Es bestanden hier jedoch keine signifikante Expressionsänderungen der Proben untereinander oder im Vergleich zu den nicht stimulierten Proben.

Zusammenfassend scheint die singuläre Stimulation mit BMP2 auf die Präosteoblasten und die Intermediärzone hemmend und auf die Fibroblasten steigernd hinsichtlich der Expression von COL5A1 zu wirken. Dies ist aufgrund mangelnder, signifikanter Expressionsänderungen der Proben untereinander nicht eindeutig belegbar. (Siehe Abbildungen 30, 31 und 32 sowie Tabelle 20)

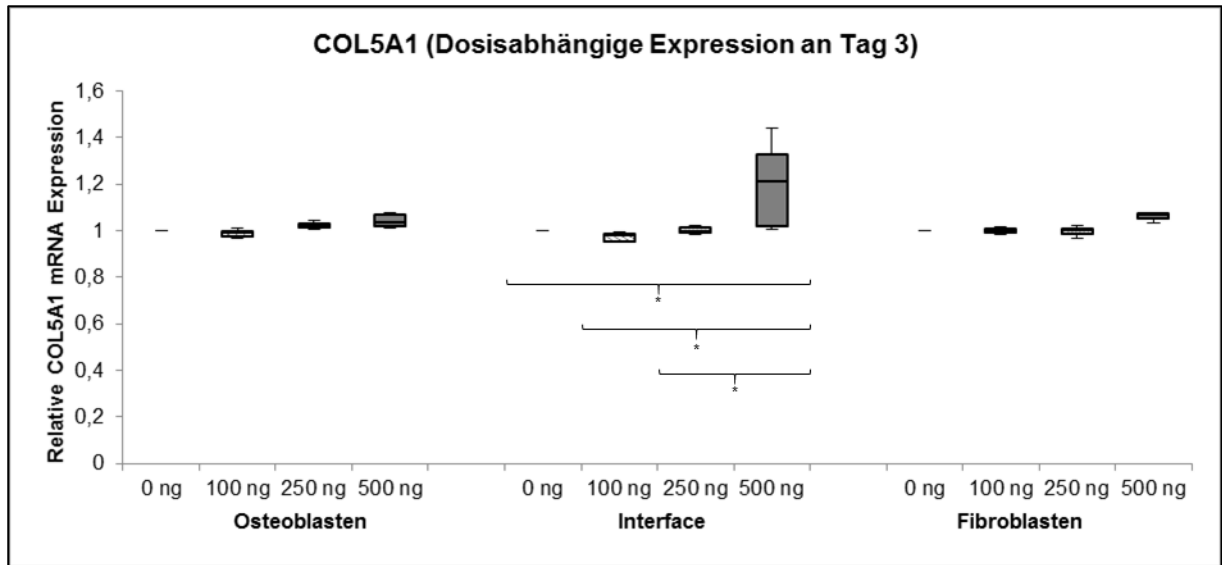


Abbildung 31: Graphische Darstellung der Expression von COL5A1 nach drei Tagen singulärer Stimulation mit BMP2

Mittlerer Querstrich: Median

Oberer und unterer Querstrich: Minimum und Maximum

Obere und untere Begrenzung des Kastens: 25. und 75. Perzentile

* Die Änderung der Expression zwischen diesen Proben ist signifikant ($p < 0,05$)

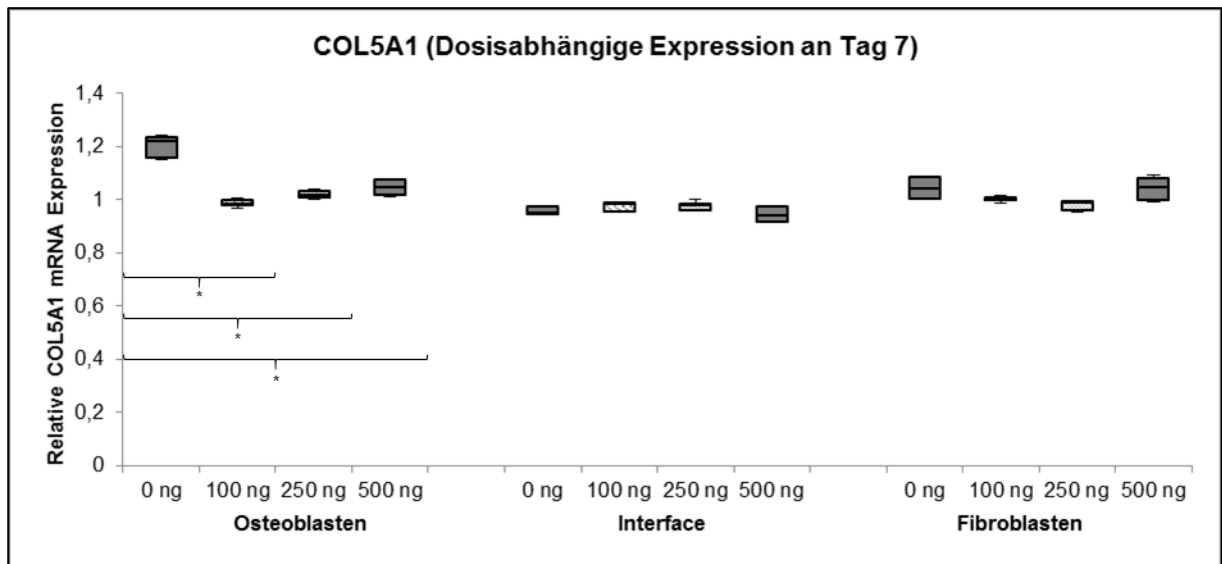


Abbildung 32: Graphische Darstellung der Expression von COL5A1 nach sieben Tagen singulärer Stimulation mit BMP2

Mittlerer Querstrich: Median

Oberer und unterer Querstrich: Minimum und Maximum

Obere und untere Begrenzung des Kastens: 25. und 75. Perzentile

* Die Änderung der Expression zwischen diesen Proben ist signifikant ($p < 0,05$)

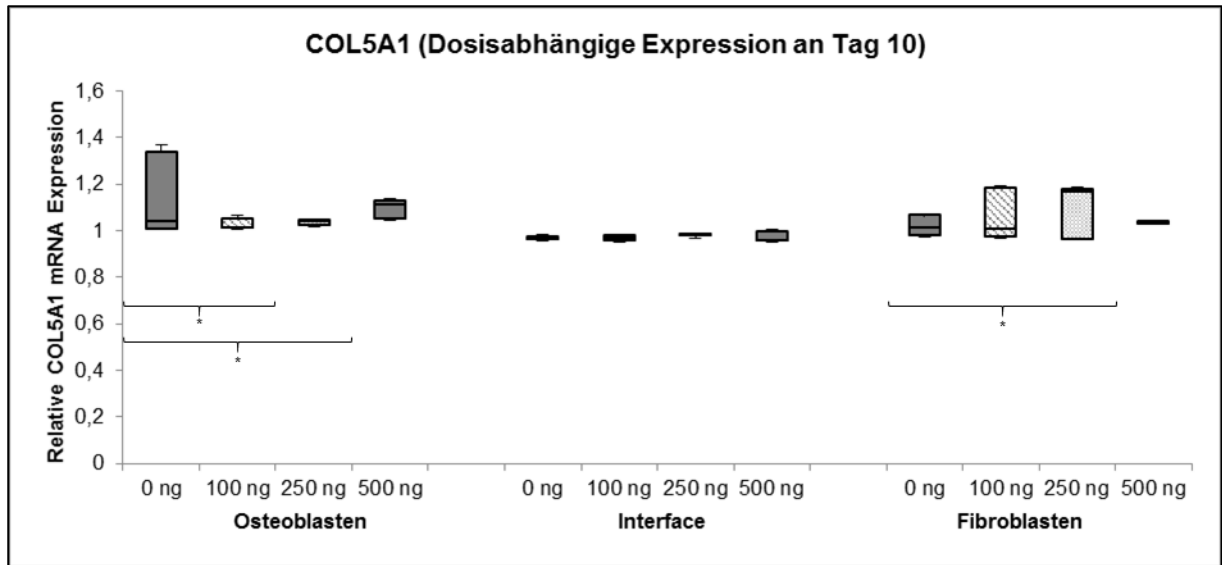


Abbildung 33: Graphische Darstellung der Expression von COL5A1 nach zehn Tagen singulärer Stimulation mit BMP2

Mittlerer Querstrich: Median

Oberer und unterer Querstrich: Minimum und Maximum

Obere und untere Begrenzung des Kastens: 25. und 75. Perzentile

* Die Änderung der Expression zwischen diesen Proben ist signifikant ($p < 0,05$)

Tabelle 20: Relative Expression von COL5A1 nach singulärer Stimulation mit BMP2

RE COL5A1 nach singulärer Stimulation mit BMP2 an Tag 3			
	Präosteoblasten	Intermediärzone	Fibroblasten
0ng/ml			
100ng/ml	0,992	0,979	1,000
250ng/ml	1,017	0,996	1,002
500ng/ml	1,033	1,212	1,067
RE COL5A1 nach singulärer Stimulation mit BMP2 an Tag 7			
	Präosteoblasten	Intermediärzone	Fibroblasten
0ng/ml	1,222	0,952	1,043
100ng/ml	0,984	0,981	0,997
250ng/ml	1,015	0,977	0,988
500ng/ml	1,048	0,938	1,048
RE COL5A1 nach singulärer Stimulation mit BMP2 an Tag 10			
	Präosteoblasten	Intermediärzone	Fibroblasten
0ng/ml	1,041	0,964	1,012
100ng/ml	1,016	0,969	1,009
250ng/ml	1,039	0,981	1,170
500ng/ml	1,114	0,960	1,033

Tabelle 20: Relative Expression von COL5A1 nach singulärer Stimulation mit BMP2

4.3.2. Multiple Stimulation mit BMP2

Im Bereich der Präosteoblasten war die relative Expression von COL5A1 an Tag sieben in den stimulierten Proben signifikant reduziert im Vergleich zu den nicht stimulierten Proben (100ng/ml und 250ng/ml) bzw. der Expressionsanstieg geringer als der in diesen (500ng/ml). Hier zeigten die nicht stimulierten Proben einen 1,327-fachen, im Vergleich zu den stimulierten Proben signifikanten Anstieg der relativen Expression. An Tag zehn war die der mit 100ng/ml stimulierten Proben 1,318-fach gesteigert. Diese Expressionsänderung war gegenüber den nicht stimulierten Proben zum genannten Zeitpunkt signifikant.

In der Intermediärzone zeigten an Tag drei die mit 100ng/ml stimulierten und an Tag sieben die mit 100ng/ml und 500ng/ml stimulierten Proben einen Expressionsanstieg. Die anderen stimulierten Proben zeigten zu jedem Zeitpunkt eine reduzierte Expression. Keine dieser Expressionsänderungen zwischen den stimulierten Proben und den nicht stimulierten bzw. zwischen den stimulierten Proben untereinander war signifikant.

Im Bereich der Fibroblasten zeigte die mit 100ng/ml und 250ng/ml stimulierten Proben an Tag drei einen Expressionsanstieg. Hier bestand keine signifikante Änderung im Vergleich zu den jeweils anderen stimulierten Proben. Die weiteren stimulierten Proben zeigten an Tag sieben und zehn eine reduzierte oder im Vergleich zu den nicht stimulierten Proben zum entsprechenden Zeitpunkt geringere Expression von COL5A1. Die relative Expression von COL5A1 in den nicht stimulierten Proben zeigte an Tag zehn einen 1,304-fachen, im Vergleich zu den stimulierten Proben signifikanten Anstieg.

Man kann zusammenfassend von einer expressionsmindernden Wirkung durch die multiple Stimulation mit BMP2 in Präosteoblasten, Fibroblasten und der Intermediärzone sprechen. Eine Ausnahme bilden die mit 100ng/ml stimulierten Proben an Tag Zehn aus dem Bereich der Präosteoblasten. (Siehe Abbildungen 33, 34 und 35 sowie Tabelle 21)

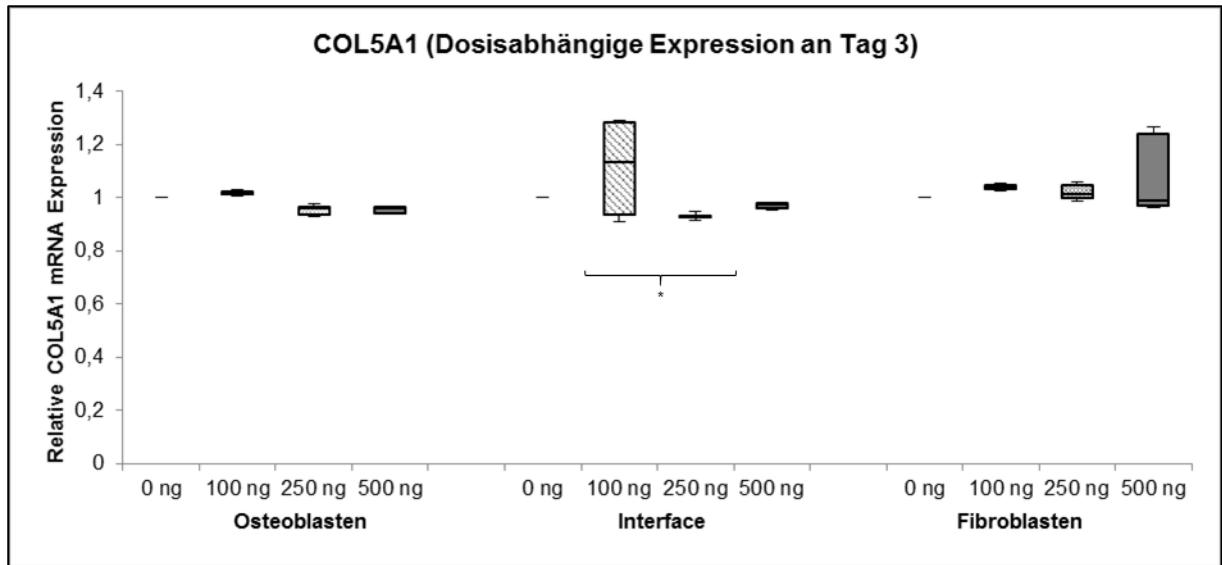


Abbildung 34: Graphische Darstellung der Expression von COL5A1 nach drei Tagen multipler Stimulation mit BMP2

Mittlerer Querstrich: Median

Oberer und unterer Querstrich: Minimum und Maximum

Obere und untere Begrenzung des Kastens: 25. und 75. Perzentile

* Die Änderung der Expression zwischen diesen Proben ist signifikant ($p < 0,05$)

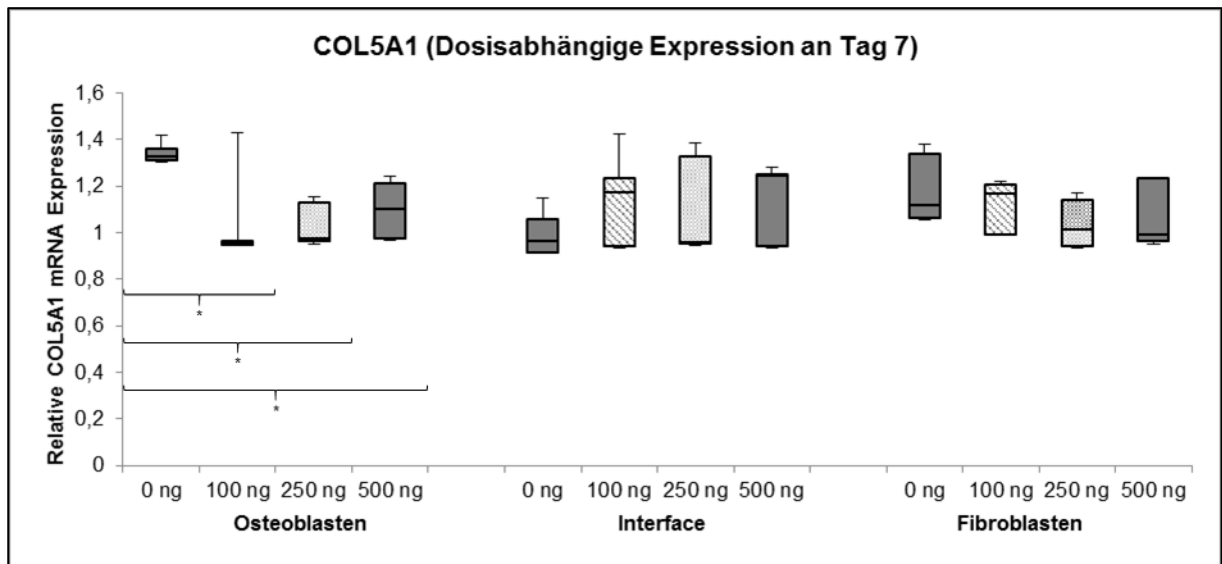


Abbildung 35: Graphische Darstellung der Expression von COL5A1 nach sieben Tagen multipler Stimulation mit BMP2

Mittlerer Querstrich: Median

Oberer und unterer Querstrich: Minimum und Maximum

Obere und untere Begrenzung des Kastens: 25. und 75. Perzentile

* Die Änderung der Expression zwischen diesen Proben ist signifikant ($p < 0,05$)

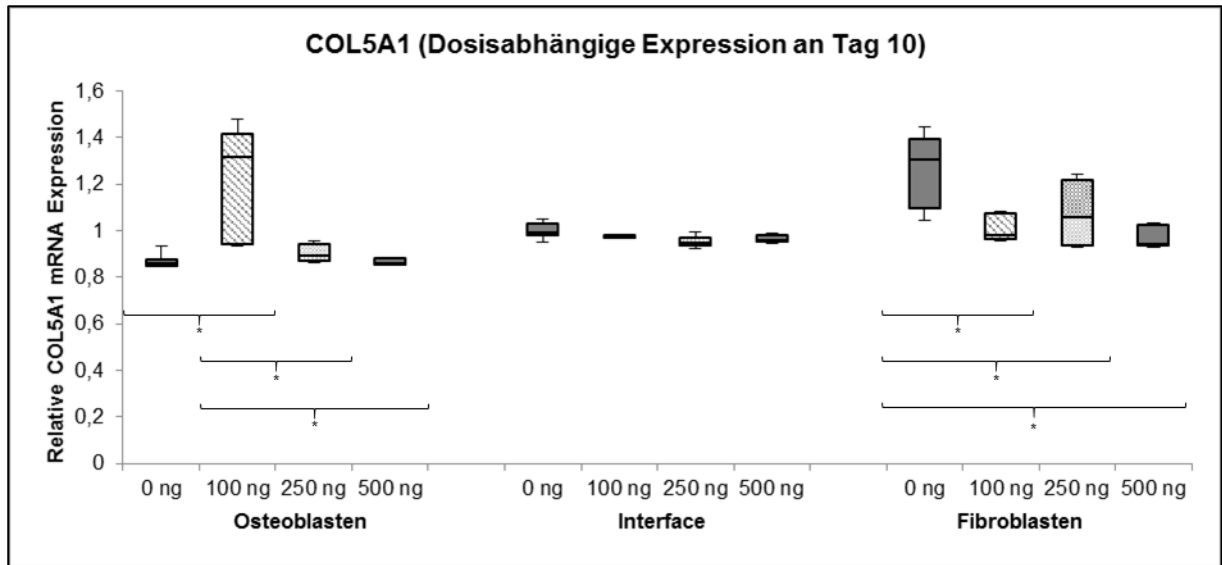


Abbildung 36: Graphische Darstellung der Expression von COL5A1 nach zehn Tagen multipler Stimulation mit BMP2

Mittlerer Querstrich: Median

Oberer und unterer Querstrich: Minimum und Maximum

Obere und untere Begrenzung des Kastens: 25. und 75. Perzentile

* Die Änderung der Expression zwischen diesen Proben ist signifikant ($p < 0,05$)

Tabelle 21: Relative Expression von COL5A1 nach multipler Stimulation mit BMP2

RE COL5A1 nach multipler Stimulation mit BMP2 an Tag 3			
	Präosteoblasten	Intermediärzone	Fibroblasten
0ng/ml			
100ng/ml	1,014	1,131	1,040
250ng/ml	0,960	0,927	1,012
500ng/ml	0,960	0,972	0,991
RE COL5A1 nach multipler Stimulation mit BMP2 an Tag 7			
	Präosteoblasten	Intermediärzone	Fibroblasten
0ng/ml	1,327	0,963	1,118
100ng/ml	0,957	1,172	1,167
250ng/ml	0,978	0,961	1,012
500ng/ml	1,100	1,243	0,992
RE COL5A1 nach multipler Stimulation mit BMP2 an Tag 10			
	Präosteoblasten	Intermediärzone	Fibroblasten
0ng/ml	0,861	0,989	1,304
100ng/ml	1,318	0,974	1,057
250ng/ml	0,893	0,950	0,981
500ng/ml	0,858	0,960	0,940

4.3.3. Singuläre Stimulation mit BMP7

Die Expression von COL5A1 war im Bereich der Präosteoblasten nach singulärer Stimulation mit BMP7 in den meisten Proben reduziert. Lediglich die mit 250ng/ml stimulierten Proben zeigten an Tag drei und zehn eine 1,005-fach bzw. 1,016-fach gesteigerte relative Expression. Diese Expressionsänderungen waren im Vergleich zu den nicht stimulierten Proben zum entsprechenden Zeitpunkt jedoch nicht signifikant.

In der Intermediärzone war bei keiner Probe eine signifikante Expressionsänderung auszumachen. Die meisten Proben zeigten eine reduzierte Expression. An Tag drei war bei den mit 250ng/ml stimulierten Proben ein minimaler, 1,001-facher Expressionsanstieg zu beobachten.

Im Bereich der Fibroblasten war an Tag drei bei den mit 100ng/ml und 250ng/ml stimulierten Proben ein 1,052-facher bzw. 1,004-facher Anstieg der relativen Expression auszumachen. Beide Expressionsänderungen waren im Vergleich zu den mit 500ng/ml stimulierten Proben zum genannten Zeitpunkt signifikant. Die weiteren Proben zeigten reduzierte Expressionswerte. Signifikante Expressionsänderungen bestanden an Tag sieben zwischen den mit 100ng/ml stimulierten und den anderen beiden stimulierten Proben.

Zusammenfassend betrachtet hat die singuläre Stimulation mit BMP7 einen eher hemmenden Effekt auf die Expression von COL5A1 im Bereich der Präosteoblasten, Fibroblasten und in der Intermediärzone. (Siehe Abbildungen 36, 37 und 38 sowie Tabelle 22)

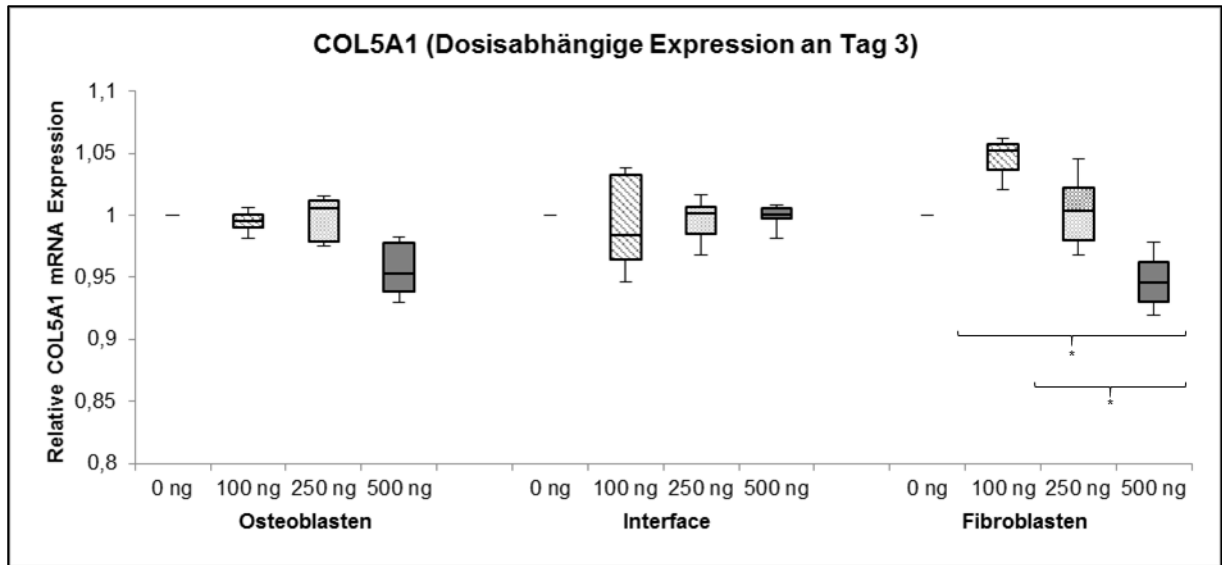


Abbildung 37: Graphische Darstellung der Expression von COL5A1 nach drei Tagen singulärer Stimulation mit BMP7

Mittlerer Querstrich: Median

Oberer und unterer Querstrich: Minimum und Maximum

Obere und untere Begrenzung des Kastens: 25. und 75. Perzentile

* Die Änderung der Expression zwischen diesen Proben ist signifikant ($p < 0,05$)

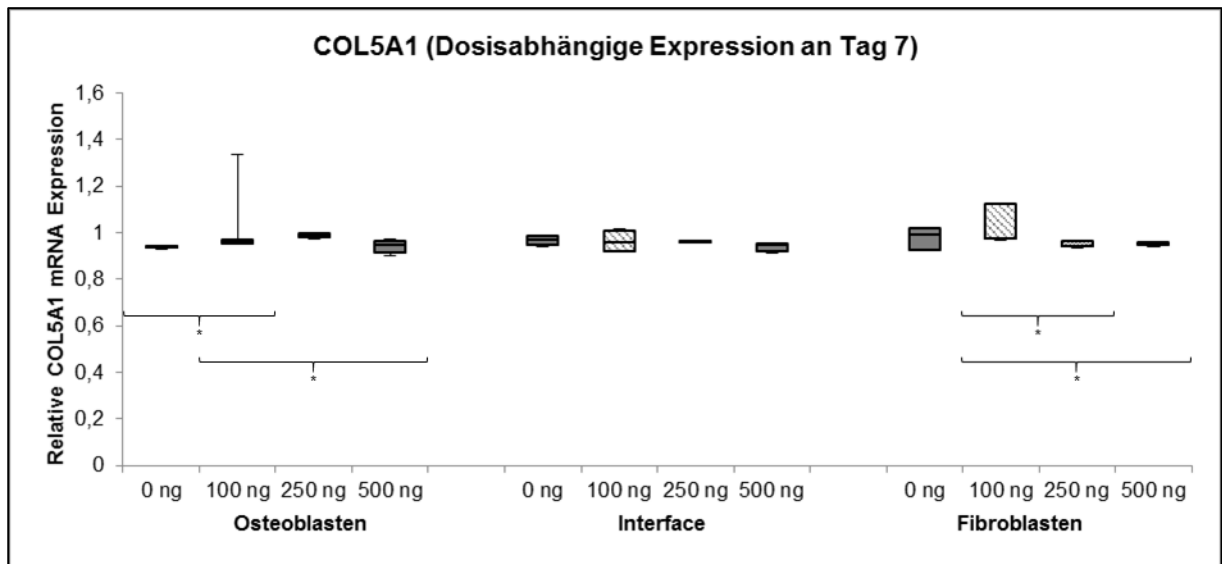


Abbildung 38: Graphische Darstellung der Expression von COL5A1 nach sieben Tagen singulärer Stimulation mit BMP7

Mittlerer Querstrich: Median

Oberer und unterer Querstrich: Minimum und Maximum

Obere und untere Begrenzung des Kastens: 25. und 75. Perzentile

* Die Änderung der Expression zwischen diesen Proben ist signifikant ($p < 0,05$)

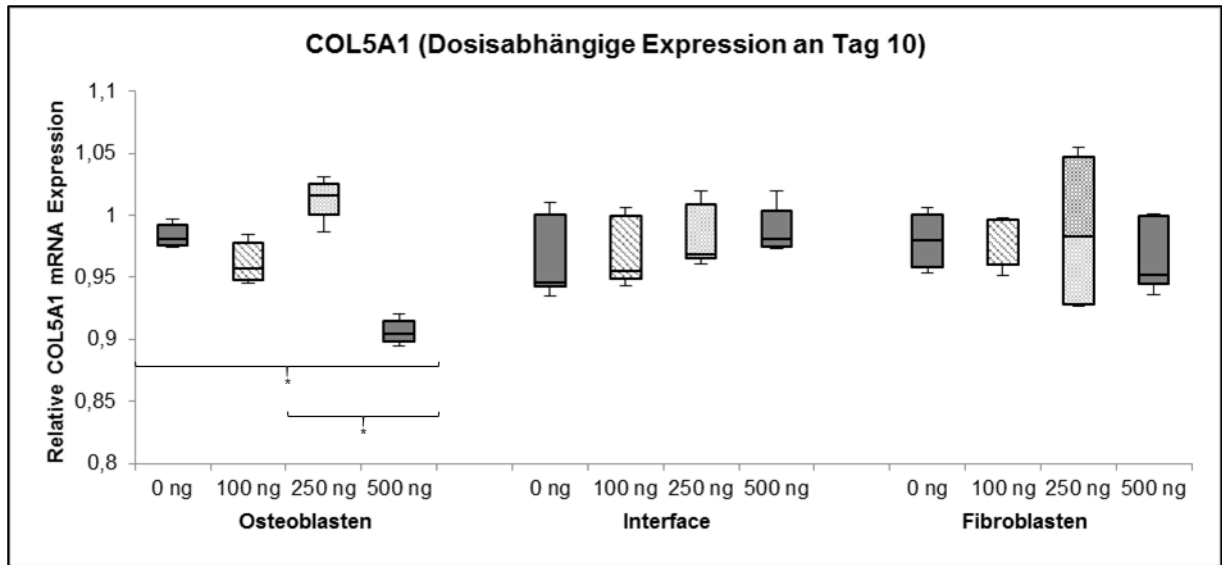


Abbildung 39: Graphische Darstellung der Expression von COL5A1 nach zehn Tagen singulärer Stimulation mit BMP7

Mittlerer Querstrich: Median

Oberer und unterer Querstrich: Minimum und Maximum

Obere und untere Begrenzung des Kastens: 25. und 75. Perzentile

* Die Änderung der Expression zwischen diesen Proben ist signifikant ($p < 0,05$)

Tabelle 22: Relative Expression von COL5A1 nach singulärer Stimulation mit BMP7

RE COL5A1 nach singulärer Stimulation mit BMP7 an Tag 3			
	Präosteoblasten	Intermediärzone	Fibroblasten
0ng/ml			
100ng/ml	0,995	0,984	1,052
250ng/ml	1,005	1,001	1,004
500ng/ml	0,952	1,000	0,946
RE COL5A1 nach singulärer Stimulation mit BMP7 an Tag 7			
	Präosteoblasten	Intermediärzone	Fibroblasten
0ng/ml	0,937	0,968	0,989
100ng/ml	0,967	0,957	0,974
250ng/ml	0,994	0,961	0,944
500ng/ml	0,949	0,950	0,951
RE COL5A1 nach singulärer Stimulation mit BMP7 an Tag 10			
	Präosteoblasten	Intermediärzone	Fibroblasten
0ng/ml	0,980	0,946	0,980
100ng/ml	0,957	0,955	0,960
250ng/ml	1,016	0,969	0,983
500ng/ml	0,905	0,981	0,952

4.3.4. Multiple Stimulation mit BMP7

Die relative Expression von COL5A1 war im Bereich der Präosteoblasten nach multipler Stimulation mit BMP7, sowohl in den stimulierten als auch in den nicht stimulierten Proben gesteigert. An Tag sieben lag die relative Expression der mit 100ng/ml und 500ng/ml stimulierten Proben über der der nicht stimulierten. Der 1,131-fache bzw. 1,123-fache Expressionsanstieg war im Vergleich zu den nicht und mit 250ng/ml stimulierten Proben zum gleichen Zeitpunkt signifikant.

In der Intermediärzone zeigten die meisten stimulierten Proben gesteigerte Expressionswerte. Eine Ausnahme stellten die mit 250ng/ml stimulierten Proben an Tag drei. Es zeigten sich hier keine signifikante Expressionsänderungen der Proben untereinander.

Die Expression von COL5A1 im Bereich der Fibroblasten war in den mit 100ng/ml stimulierten Proben an Tag drei und zehn, in den mit 500ng/ml stimulierten an Tag sieben und zehn gesteigert. An Tag zehn zeigten die mit 100ng/ml stimulierten Proben einen 1,048-fachen, die mit 500ng/ml stimulierten einen 1,152-fachen Anstieg der relativen Expression. Beide Expressionsanstiege waren im Vergleich zu den nicht stimulierten Proben signifikant. In den anderen Proben zeigten sich reduzierte Expressionswerte. Weitere signifikante Expressionsänderungen zwischen den Proben bestanden nicht.

Zusammenfassend betrachtet hat die multiple Stimulation mit BMP7 auf die Expression von COL5A1 eine tendenziell steigernde Wirkung in Osteoblasten und in der Intermediärzone, während bei den Fibroblasten die meisten Proben eine unveränderte bzw. tendenziell reduzierte Expression zeigten, mit signifikantem zeitabhängigem Anstieg bei den mit 100ng/ml und 500ng/ml stimulierten Proben. (Siehe Abbildungen 39, 40 und 41 sowie Tabelle 23)

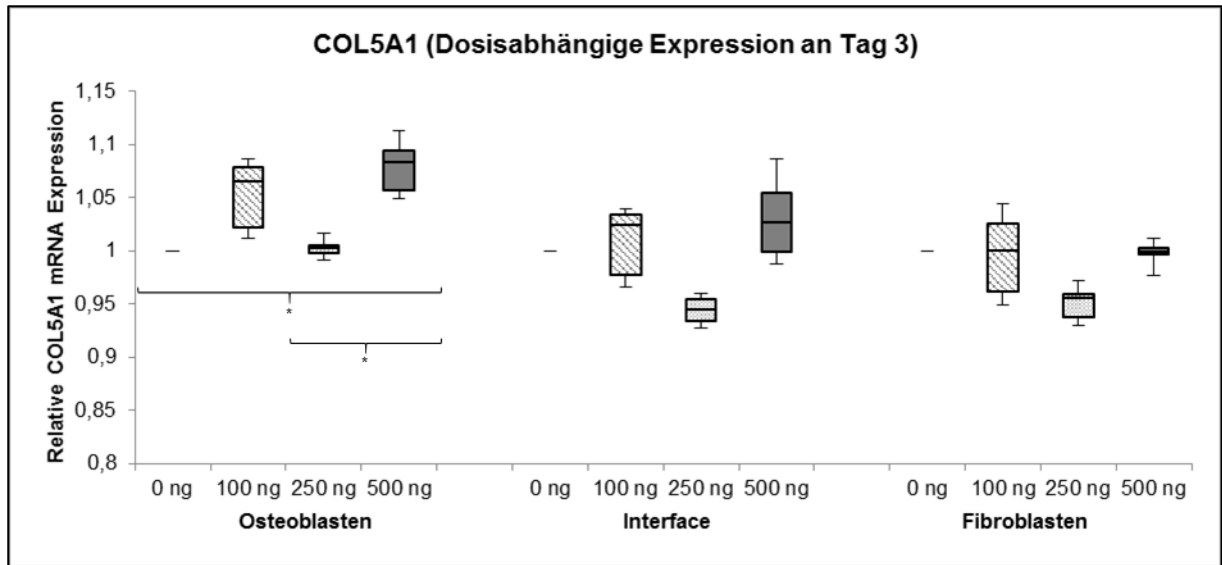


Abbildung 40: Graphische Darstellung der Expression von COL5A1 nach drei Tagen multipler Stimulation mit BMP7

Mittlerer Querstrich: Median

Oberer und unterer Querstrich: Minimum und Maximum

Obere und untere Begrenzung des Kastens: 25. und 75. Perzentile

* Die Änderung der Expression zwischen diesen Proben ist signifikant ($p < 0,05$)

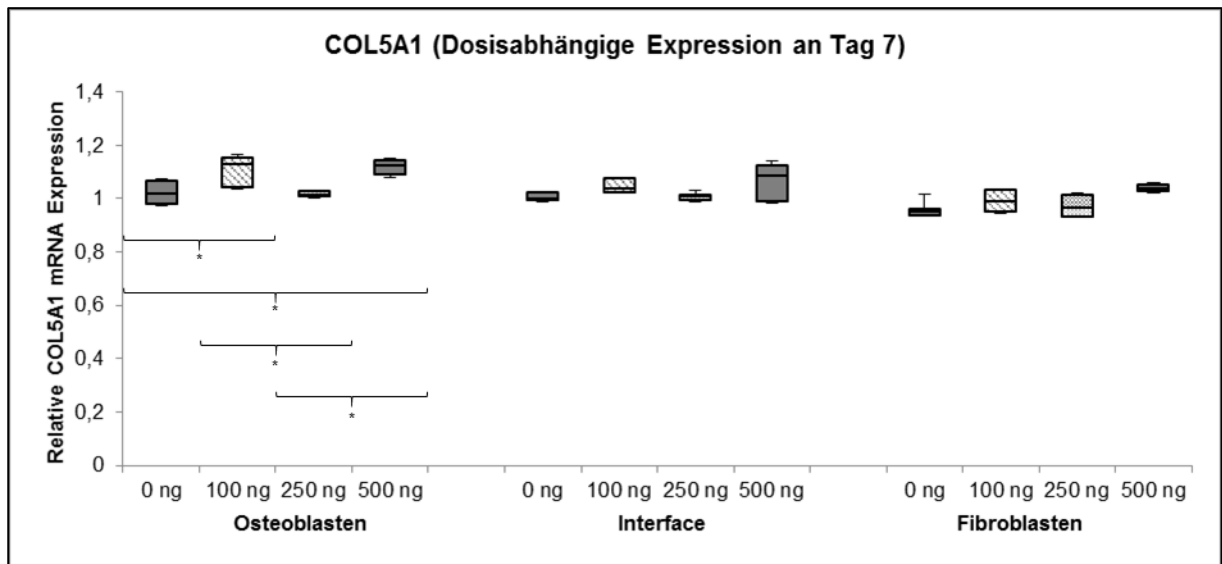


Abbildung 41: Graphische Darstellung der Expression von COL5A1 nach sieben Tagen multipler Stimulation mit BMP7

Mittlerer Querstrich: Median

Oberer und unterer Querstrich: Minimum und Maximum

Obere und untere Begrenzung des Kastens: 25. und 75. Perzentile

* Die Änderung der Expression zwischen diesen Proben ist signifikant ($p < 0,05$)

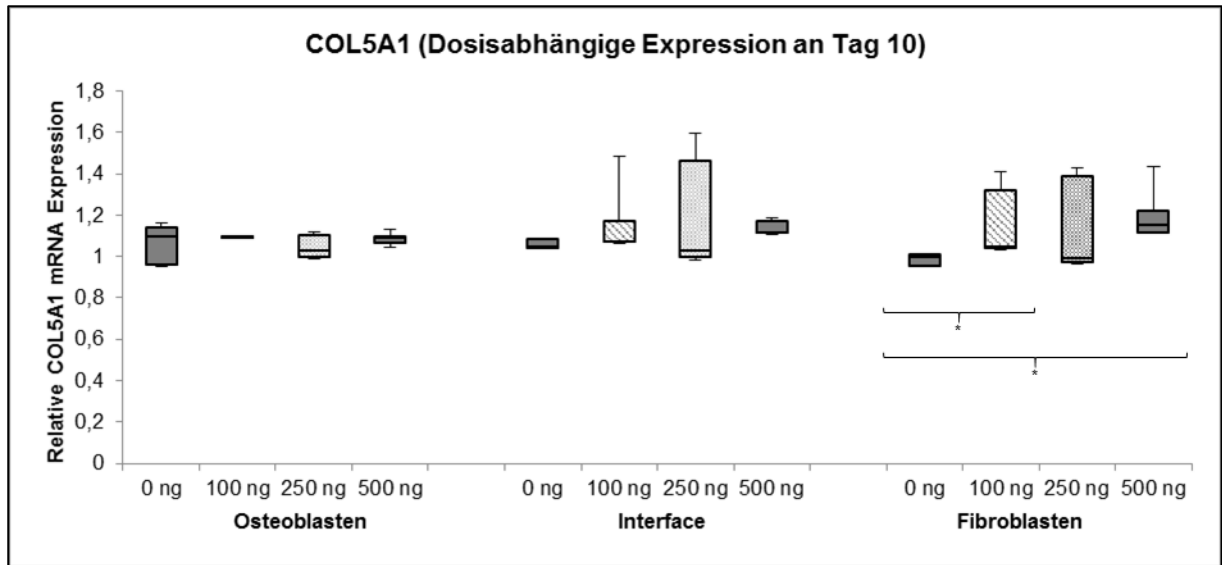


Abbildung 42: Graphische Darstellung der Expression von COL5A1 nach zehn Tagen multipler Stimulation mit BMP7

Mittlerer Querstrich: Median

Oberer und unterer Querstrich: Minimum und Maximum

Obere und untere Begrenzung des Kastens: 25. und 75. Perzentile

* Die Änderung der Expression zwischen diesen Proben ist signifikant ($p < 0,05$)

Tabelle 23: Relative Expression von COL5A1 nach multipler Stimulation mit BMP7

RE COL5A1 nach multipler Stimulation mit BMP7 an Tag 3			
	Präosteoblasten	Intermediärzone	Fibroblasten
0ng/ml			
100ng/ml	1,065	1,025	1,000
250ng/ml	1,002	0,945	0,955
500ng/ml	1,083	1,026	0,998
RE COL5A1 nach multipler Stimulation mit BMP7 an Tag 7			
	Präosteoblasten	Intermediärzone	Fibroblasten
0ng/ml	1.019	1,001	0,952
100ng/ml	1,131	1,038	0,990
250ng/ml	1,012	1,008	0,967
500ng/ml	1,123	1,088	1,040
RE COL5A1 nach multipler Stimulation mit BMP7 an Tag 10			
	Präosteoblasten	Intermediärzone	Fibroblasten
0ng/ml	1,099	1,047	0,998
100ng/ml	1,093	1,071	1,048
250ng/ml	1,030	1,028	0,992
500ng/ml	1,091	1,115	1,152

4.4. Expression von DCN

4.4.1. Singuläre Stimulation mit BMP2

Die relative Expression von DCN war im Bereich der Präosteoblasten an Tag sieben sowohl in den stimulierten als auch in den nicht stimulierten erhöht. Dabei zeigten die nicht stimulierten Proben einen 1,186-fachen, im Vergleich zu den anderen Proben signifikanten Anstieg dieser. Die Expression der nicht stimulierten Proben lag hier über der der nicht stimulierten. An Tag zehn zeigten ebenfalls alle Proben einen Anstieg der relativen Expression, wobei die der stimulierten Proben über der der nicht stimulierten Proben lag. Hiervon waren keine Expressionsänderungen untereinander signifikant.

In der Intermediärzone zeigte sich eine zeitliche Abnahme der Expression in den stimulierten Proben. An Tag zehn zeigten alle stimulierten Proben eine reduzierte Expression, die im Vergleich zu den nicht stimulierten Proben jeweils signifikant war. Die mit 500ng/ml stimulierten Proben zeigten an Tag drei und sieben noch eine 1,167-fach bzw. 1,002-fach gesteigerte Expression. Diese gesteigerten Expressionswerte waren an Tag drei im Vergleich zu allen weiteren Proben und an Tag sieben im Vergleich zu den nicht stimulierten signifikant.

Im Bereich der Fibroblasten war die DCN Expression zu jedem Zeitpunkt gesteigert. Die mit 250ng/ml stimulierten Proben zeigten an Tag zehn einen deutlichen, 1,244-fachen Anstieg der relativen Expression. Dieser war im Vergleich zu den anderen Proben an Tag zehn signifikant.

Zusammenfassend scheint die singuläre Stimulation mit BMP2 expressionssteigernd auf Fibroblasten und Präosteoblasten zu wirken, während im Bereich der Intermediärzone im zeitlichen Verlauf eine Abnahme der relativen Expression zu beobachten war. (Abbildungen 42,43 und 44 sowie Tabelle 24)

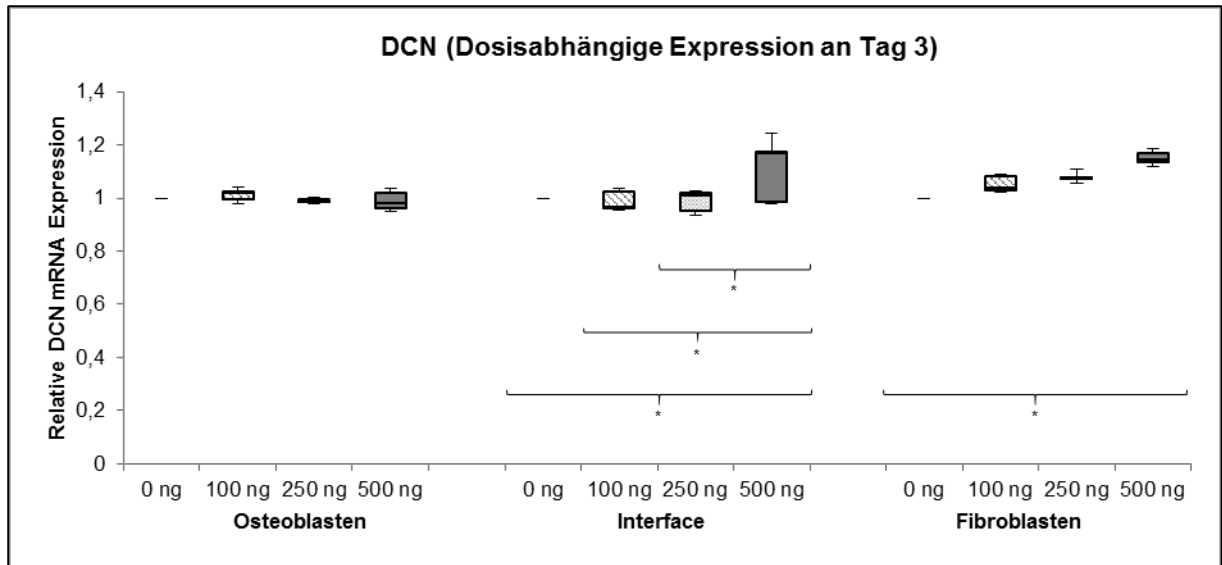


Abbildung 43: Graphische Darstellung der Expression von DCN nach drei Tagen singulärer Stimulation mit BMP2

Mittlerer Querstrich: Median

Oberer und unterer Querstrich: Minimum und Maximum

Obere und untere Begrenzung des Kastens: 25. und 75. Perzentile

* Die Änderung der Expression zwischen diesen Proben ist signifikant ($p < 0,05$)

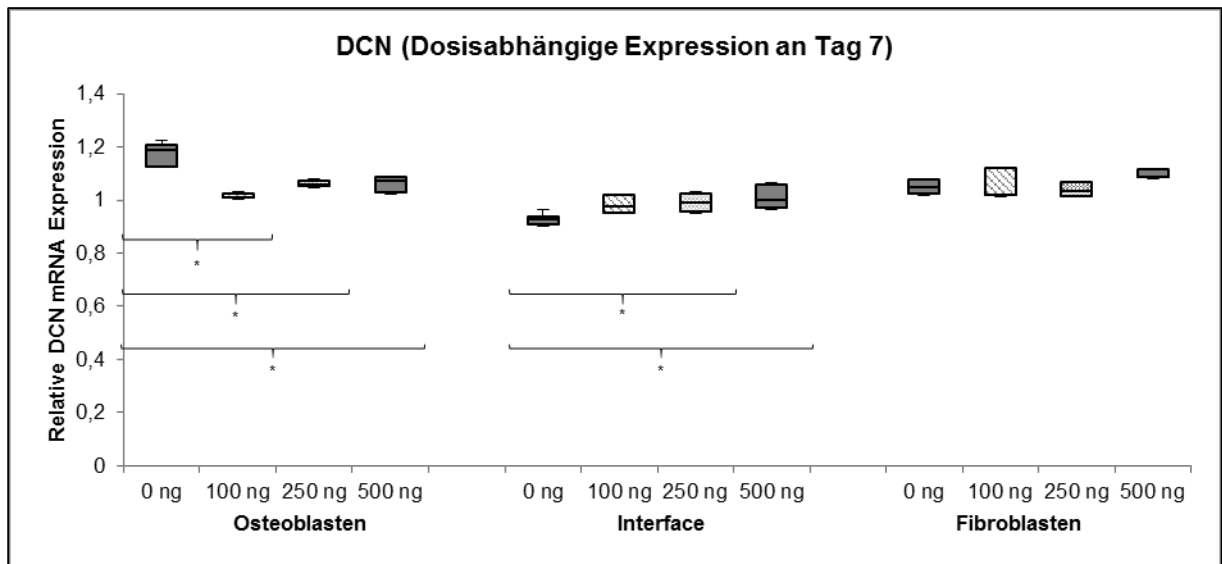


Abbildung 44: Graphische Darstellung der Expression von DCN nach sieben Tagen singulärer Stimulation mit BMP2

Mittlerer Querstrich: Median

Oberer und unterer Querstrich: Minimum und Maximum

Obere und untere Begrenzung des Kastens: 25. und 75. Perzentile

* Die Änderung der Expression zwischen diesen Proben ist signifikant ($p < 0,05$)

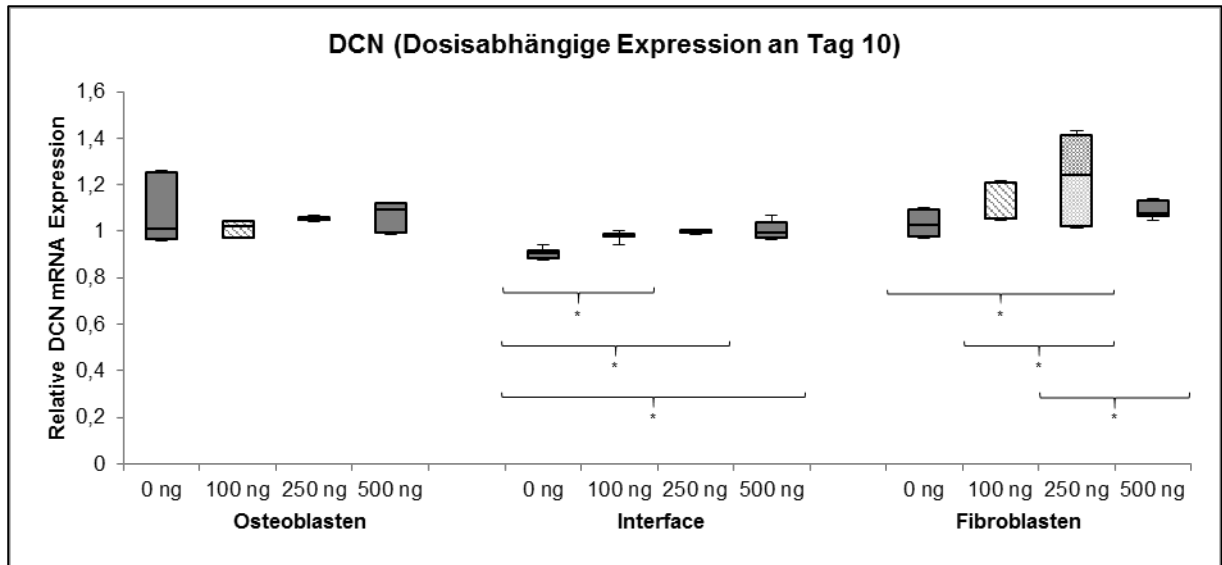


Abbildung 45: Graphische Darstellung der Expression von DCN nach zehn Tagen singulärer Stimulation mit BMP2

Mittlerer Querstrich: Median

Oberer und unterer Querstrich: Minimum und Maximum

Obere und untere Begrenzung des Kastens: 25. und 75. Perzentile

* Die Änderung der Expression zwischen diesen Proben ist signifikant ($p < 0,05$)

Tabelle 24: Relative Expression von DCN nach singulärer Stimulation mit BMP2

RE DCN nach singulärer Stimulation mit BMP2 an Tag 3			
	Präosteoblasten	Intermediärzone	Fibroblasten
0ng/ml			
100ng/ml	1,018	0,966	1,040
250ng/ml	0,987	1,011	1,073
500ng/ml	0,981	1,167	1,147
RE DCN nach singulärer Stimulation mit BMP2 an Tag 7			
	Präosteoblasten	Intermediärzone	Fibroblasten
0ng/ml	1,186	0,926	1,048
100ng/ml	1,011	0,974	1,020
250ng/ml	1,060	0,991	1,036
500ng/ml	1,072	1,002	1,086
RE DCN nach singulärer Stimulation mit BMP2 an Tag 10			
	Präosteoblasten	Intermediärzone	Fibroblasten
0ng/ml	1,008	0,903	1,028
100ng/ml	1,023	0,981	1,057
250ng/ml	1,048	0,998	1,244
500ng/ml	1,096	0,995	1,076

4.4.2. Multiple Stimulation mit BMP2

Die Expression von DCN zeigte im Bereich der Präosteoblasten, nach multipler Stimulation mit BMP2, in den meisten stimulierten Proben geringere Anstiege als in den nicht stimulierten Proben und teilweise eine Abnahme dieser. Bei den nicht stimulierten Proben war an Tag sieben ein im Vergleich zu den stimulierten Proben signifikanter, 1,181-facher Anstieg der relativen Expression zu beobachten. Lediglich die mit 100ng/ml stimulierten Proben an Tag zehn zeigten im Vergleich zu den anderen Proben einen signifikanten, 1,113-fachen Expressionsanstieg.

In der Intermediärzone zeigten die stimulierten Proben an Tag sieben eine im Vergleich zu den nicht stimulierten Proben signifikante Steigerung der relativen Expression. Es zeigte sich ein 1,025-facher Anstieg dieser bei den mit 100ng/ml stimulierten Proben, ein 1,007-facher bei den mit 250ng/ml stimulierten und ein 1,155-facher bei dem mit 500ng/ml stimulierten. Ansonsten zeigten sich in den stimulierten Proben reduzierte bzw. nicht signifikant gesteigerte Expressionen.

Im Bereich der Fibroblasten zeigte sich eine verminderte bzw. weniger hohe Expression von DCN in den stimulierten als in den nicht stimulierten Proben. Die nicht stimulierten Proben zeigten einen Anstieg der relativen Expression im zeitlichen Verlauf. Diese war an Tag zehn im Vergleich zu den stimulierten Proben, signifikant um das 1,125-fache gesteigert.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die multiple Stimulation mit BMP2 in den Präosteoblasten und den Fibroblasten eher hemmend auf die Expression von DCN wirkte. Im Bereich der Intermediärzone war an Tag sieben eine Expressionssteigernd Wirkung nach multipler Stimulation mit BMP2 auszumachen. (Siehe Abbildungen 45, 46 und 47 sowie Tabelle 25)

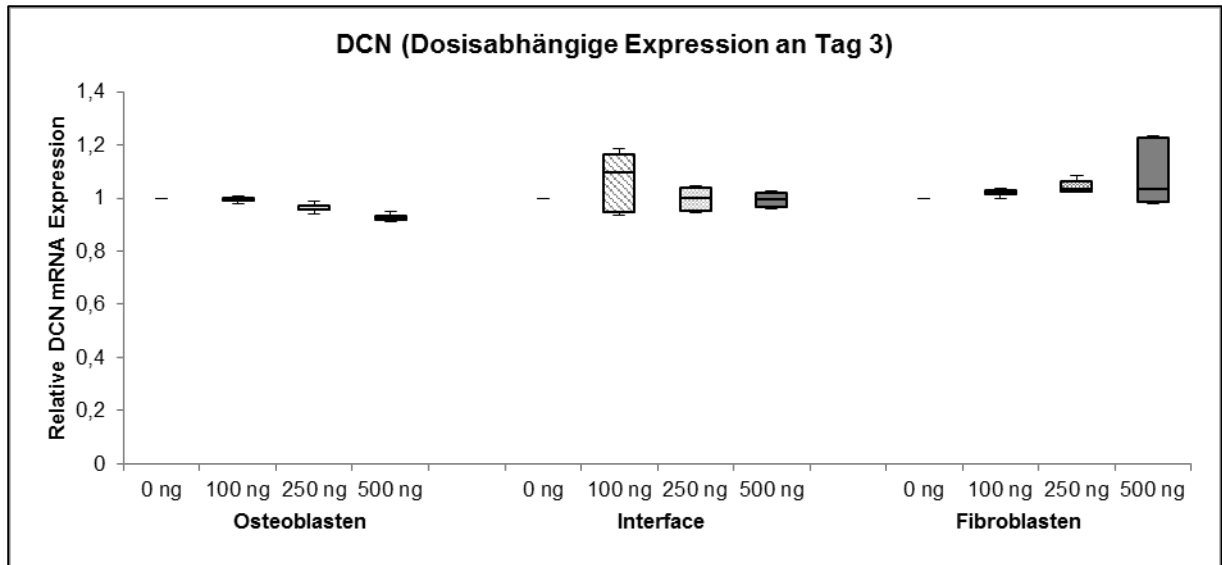


Abbildung 46: Graphische Darstellung der Expression von DCN nach drei Tagen multipler Stimulation mit BMP2

Mittlerer Querstrich: Median

Oberer und unterer Querstrich: Minimum und Maximum

Obere und untere Begrenzung des Kastens: 25. und 75. Perzentile

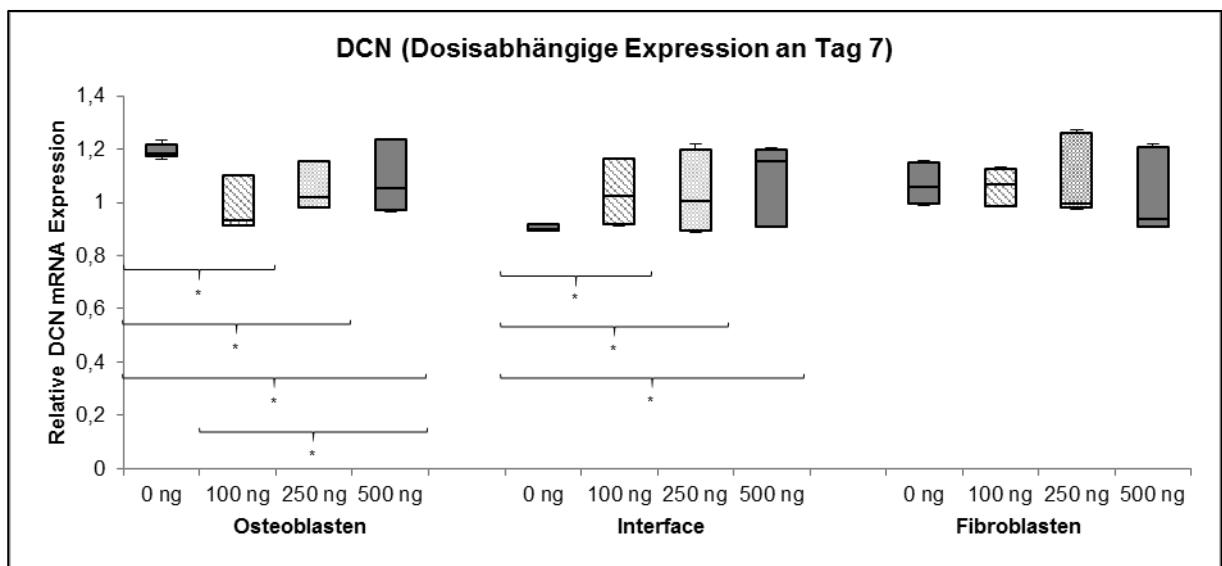


Abbildung 47: Graphische Darstellung der Expression von DCN nach sieben Tagen multipler Stimulation mit BMP2

Mittlerer Querstrich: Median

Oberer und unterer

Querstrich: Minimum und Maximum

Obere und untere Begrenzung des Kastens: 25. und 75. Perzentile

* Die Änderung der Expression zwischen diesen Proben ist signifikant ($p < 0,05$)

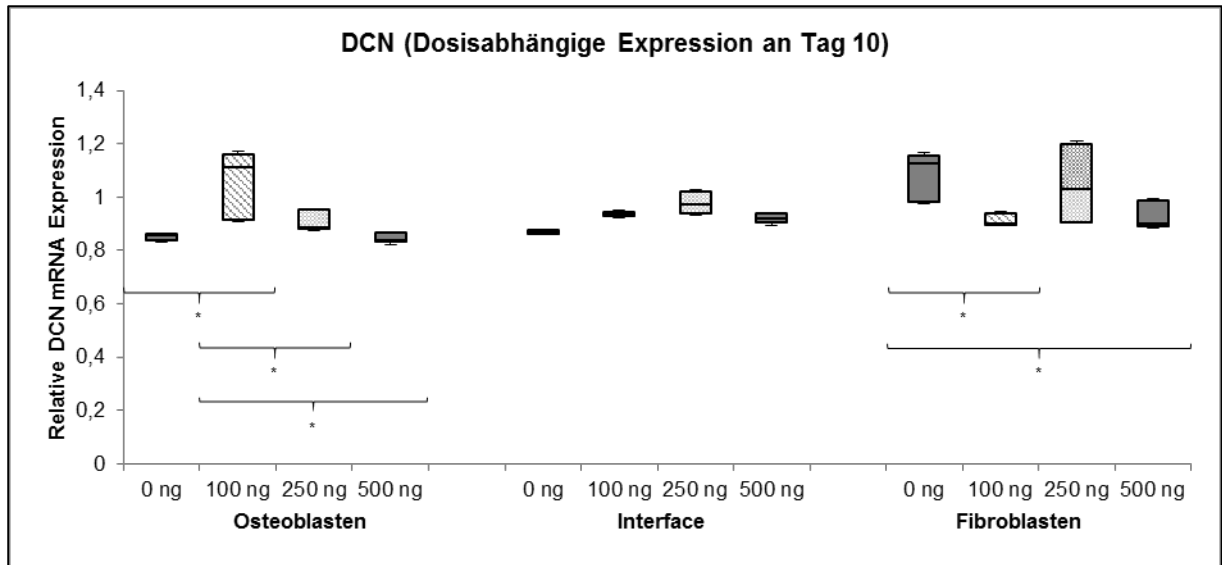


Abbildung 48: Graphische Darstellung der Expression von DCN nach zehn Tagen multipler Stimulation mit BMP2

Mittlerer Querstrich: Median

Oberer und unterer Querstrich: Minimum und Maximum

Obere und untere Begrenzung des Kastens: 25. und 75. Perzentile

* Die Änderung der Expression zwischen diesen Proben ist signifikant ($p < 0,05$)

Tabelle 25: Relative Expression von DCN nach multipler Stimulation mit BMP2

RE DCN nach multipler Stimulation mit BMP2 an Tag 3			
	Präosteoblasten	Intermediärzone	Fibroblasten
0ng/ml			
100ng/ml	0,996	1,097	1,024
250ng/ml	0,958	0,999	1,032
500ng/ml	0,921	0,995	1,034
RE DCN nach multipler Stimulation mit BMP2 an Tag 7			
	Präosteoblasten	Intermediärzone	Fibroblasten
0ng/ml	1,181	0,897	1,058
100ng/ml	0,931	1,025	1,068
250ng/ml	1,020	1,007	0,994
500ng/ml	1,054	1,155	0,937
RE DCN nach multipler Stimulation mit BMP2 an Tag 10			
	Präosteoblasten	Intermediärzone	Fibroblasten
0ng/ml	0,856	0,869	1,125
100ng/ml	1,113	0,934	0,900
250ng/ml	0,887	0,971	1,033
500ng/ml	0,840	0,920	0,903

4.4.3. Singuläre Stimulation mit BMP7

Im Bereich der Präosteoblasten war die relative Expression von DCN nach singulärer Stimulation mit BMP7 dosis- und zeitpunktunabhängig reduziert. Es zeigten sich hier keine signifikanten Expressionsänderungen.

In der Intermediärzone zeigten die meisten Proben reduzierte Expressionswerte. Bei den mit 500ng/ml stimulierten Proben kam es an Tag drei zu einem leichten, 1,013-fachen Anstieg der relativen Expression. Diese Expressionssteigerung war im Vergleich zu den anderen stimulierten Proben zum selben Zeitpunkt signifikant.

Im Bereich der Fibroblasten war die Expression von DCN in jeder Probe reduziert. Es waren hier lediglich die Expressionsänderungen zwischen den mit 250ng/ml und 100ng/ml stimulierten Proben sowie den mit 250ng/ml und nicht stimulierten an Tag sieben signifikant.

Die singuläre Stimulation mit BMP7 führte zu einer reduzierten Expression von DCN in Präosteoblasten und Fibroblasten. In der Intermediärzone war lediglich bei den mit 500ng/ml stimulierten Proben an Tag drei ein leichter Expressionsanstieg auszumachen. Ansonsten fand sich hier auch eine reduzierte Expression. (Siehe Abbildungen 48, 49 und 50 sowie Tabelle 26)

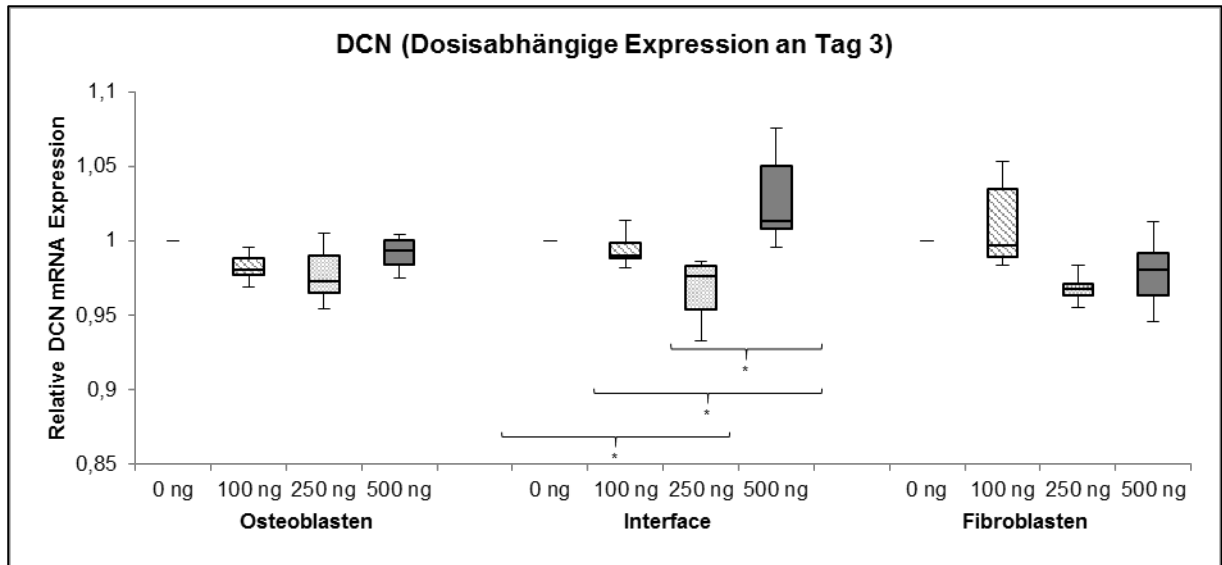


Abbildung 49: Graphische Darstellung der Expression von DCN nach drei Tagen singulärer Stimulation mit BMP7

Mittlerer Querstrich: Median

Oberer und unterer Querstrich: Minimum und Maximum

Obere und untere Begrenzung des Kastens: 25. und 75. Perzentile

* Die Änderung der Expression zwischen diesen Proben ist signifikant ($p < 0,05$)

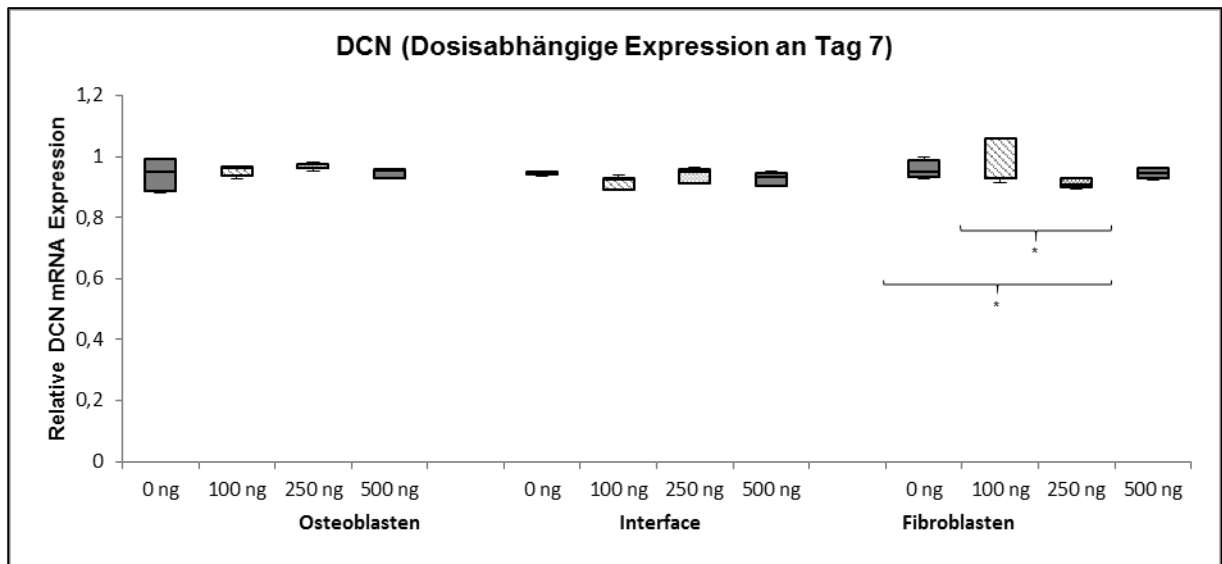


Abbildung 50: Graphische Darstellung der Expression von DCN nach sieben Tagen singulärer Stimulation mit BMP7

Mittlerer Querstrich: Median

Oberer und unterer Querstrich: Minimum und Maximum

Obere und untere Begrenzung des Kastens: 25. und 75. Perzentile

* Die Änderung der Expression zwischen diesen Proben ist signifikant ($p < 0,05$)

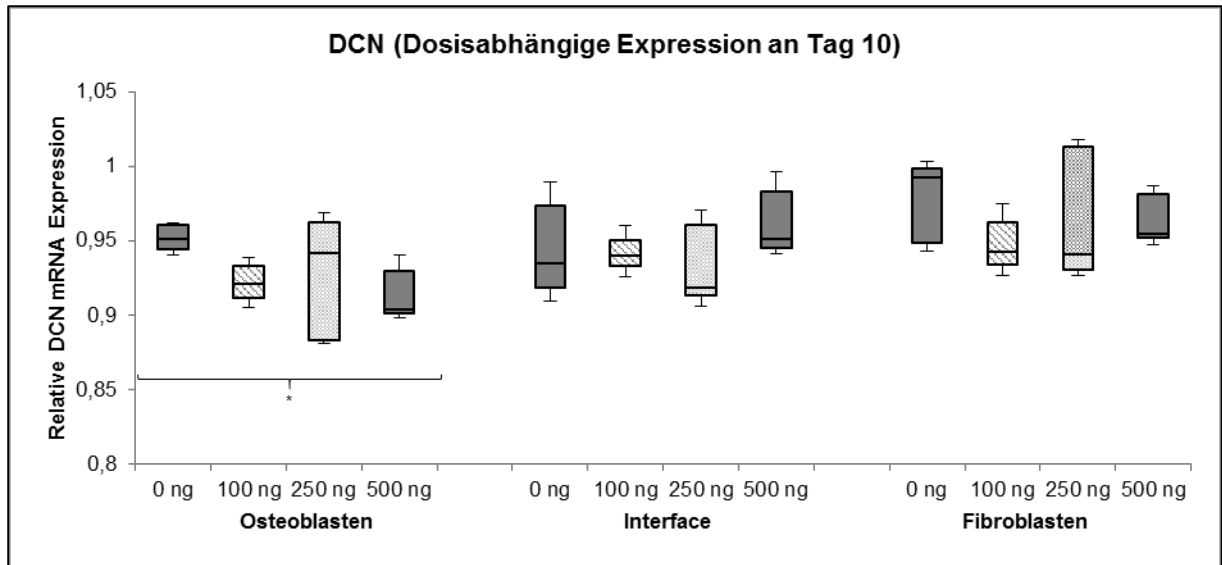


Abbildung 51: Graphische Darstellung der Expression von DCN nach zehn Tagen singulärer Stimulation mit BMP7

Mittlerer Querstrich: Median

Oberer und unterer Querstrich: Minimum und Maximum

Obere und untere Begrenzung des Kastens: 25. und 75. Perzentile

* Die Änderung der Expression zwischen diesen Proben ist signifikant ($p < 0,05$)

Tabelle 26: Relative Expression von DCN nach singulärer Stimulation mit BMP7

RE DCN nach singulärer Stimulation mit BMP7 an Tag 3			
	Präosteoblasten	Intermediärzone	Fibroblasten
0ng/ml			
100ng/ml	0,980	0,990	0,997
250ng/ml	0,973	0,976	0,967
500ng/ml	0,994	1,013	0,98
RE DCN nach singulärer Stimulation mit BMP7 an Tag 7			
	Präosteoblasten	Intermediärzone	Fibroblasten
0ng/ml	0,949	0,947	0,948
100ng/ml	0,963	0,925	0,931
250ng/ml	0,965	0,950	0,908
500ng/ml	0,953	0,933	0,946
RE DCN nach singulärer Stimulation mit BMP7 an Tag 10			
	Präosteoblasten	Intermediärzone	Fibroblasten
0ng/ml	0,951	0,935	0,993
100ng/ml	0,921	0,940	0,943
250ng/ml	0,941	0,918	0,940
500ng/ml	0,904	0,951	0,954

4.4.4. Multiple Stimulation mit BMP7

Die relative Expression von DCN war nach multipler Stimulation mit BMP7 im Bereich der Präosteoblasten in den meisten Proben gesteigert. Speziell die mit 100ng/ml stimulierten Proben zeigten an Tag drei und sieben einen 1,081-fachen und 1,086-fachen Anstieg der relativen Expression. Diese Expressionsanstiege waren im Vergleich zu den anderen Proben zum entsprechenden Zeitpunkt signifikant.

In der Intermediärzone zeigten bis auf die mit 100ng/ml stimulierten Proben an Tag drei, alle weiteren Proben reduzierte Expressionswerte. Der Expressionsanstieg bei den mit 100ng/ml stimulierten Proben zum oben genannten Zeitpunkt war im Vergleich zu den anderen Proben nicht signifikant.

Im Bereich der Fibroblasten war die Expression von DCN bei den mit 100ng/ml stimulierten Proben an Tag zehn 1,062-fach, gegenüber den nicht stimulierten signifikant gesteigert. Die anderen Proben zeigten entweder eine reduzierte, eine im Vergleich zu den nicht stimulierten Proben zum gleichen Zeitpunkt geringer gesteigerte oder eine nicht signifikant gesteigerte Expression.

Zusammengefasst zeigte sich nach multipler Stimulation mit BMP7 eine eher gesteigerte Expression von DCN im Bereich der Präosteoblasten sowie eine Reduktion dieser in den Fibroblasten und der Intermediärzone. Im Bereich der Fibroblasten war die Expression an Tag zehn nach Stimulation mit 100ng/ml jedoch gesteigert. (Siehe Abbildungen 51, 52 und 53 sowie Tabelle 27)

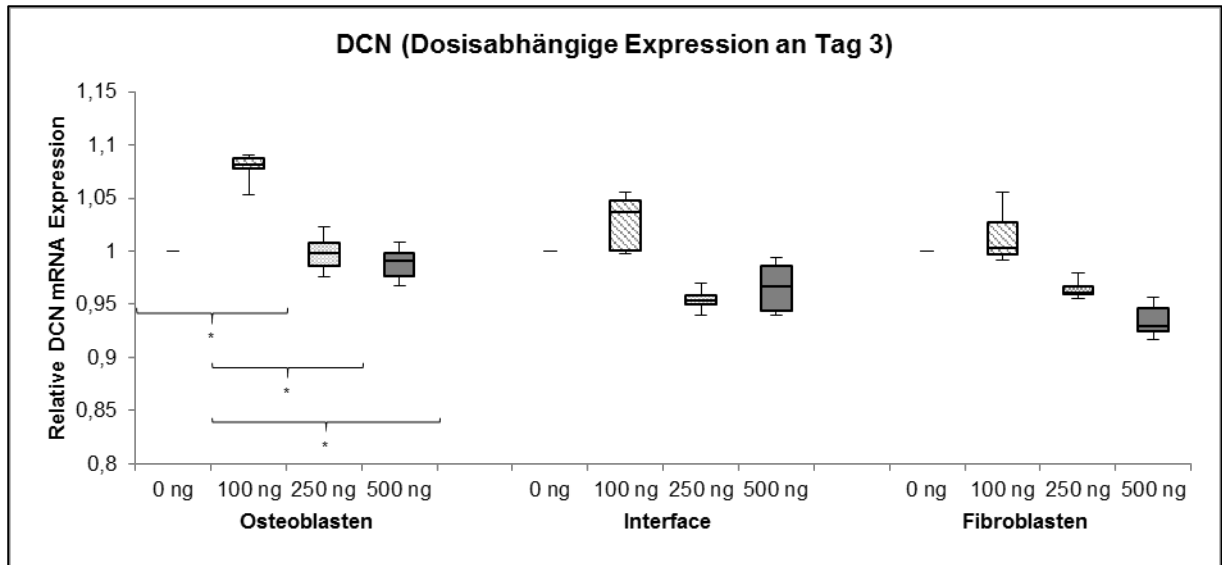


Abbildung 52: Graphische Darstellung der Expression von DCN nach drei Tagen multipler Stimulation mit BMP7

Mittlerer Querstrich: Median

Oberer und unterer Querstrich: Minimum und Maximum

Obere und untere Begrenzung des Kastens: 25. und 75. Perzentile

* Die Änderung der Expression zwischen diesen Proben ist signifikant ($p < 0,05$)

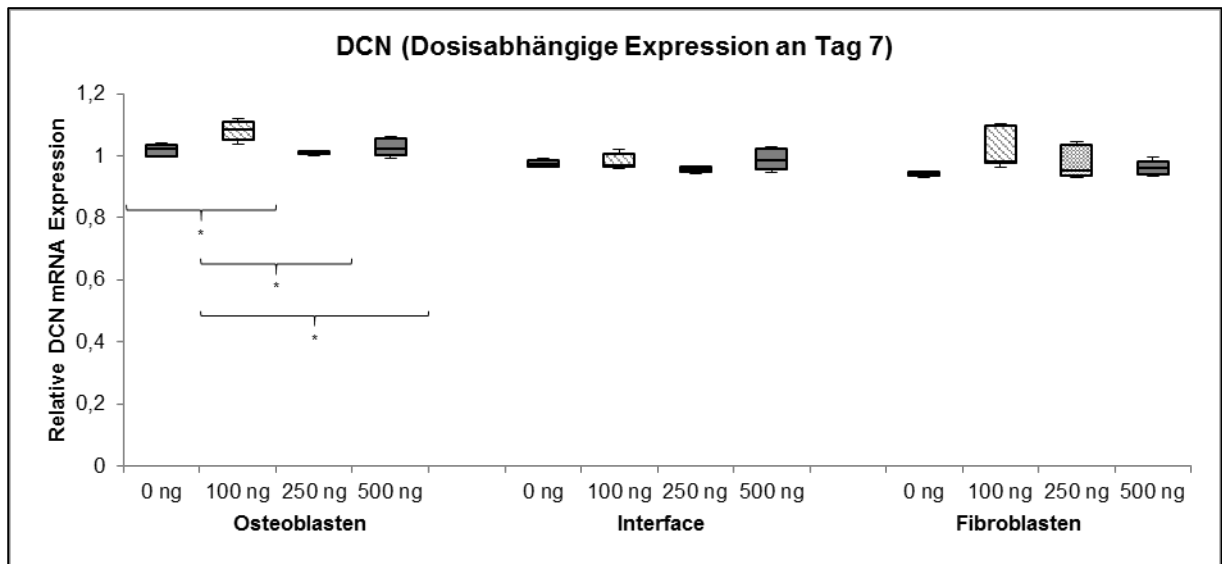


Abbildung 53: Graphische Darstellung der Expression von DCN nach sieben Tagen multipler Stimulation mit BMP7

Mittlerer Querstrich: Median

Oberer und unterer Querstrich: Minimum und Maximum

Obere und untere Begrenzung des Kastens: 25. und 75. Perzentile

* Die Änderung der Expression zwischen diesen Proben ist signifikant ($p < 0,05$)

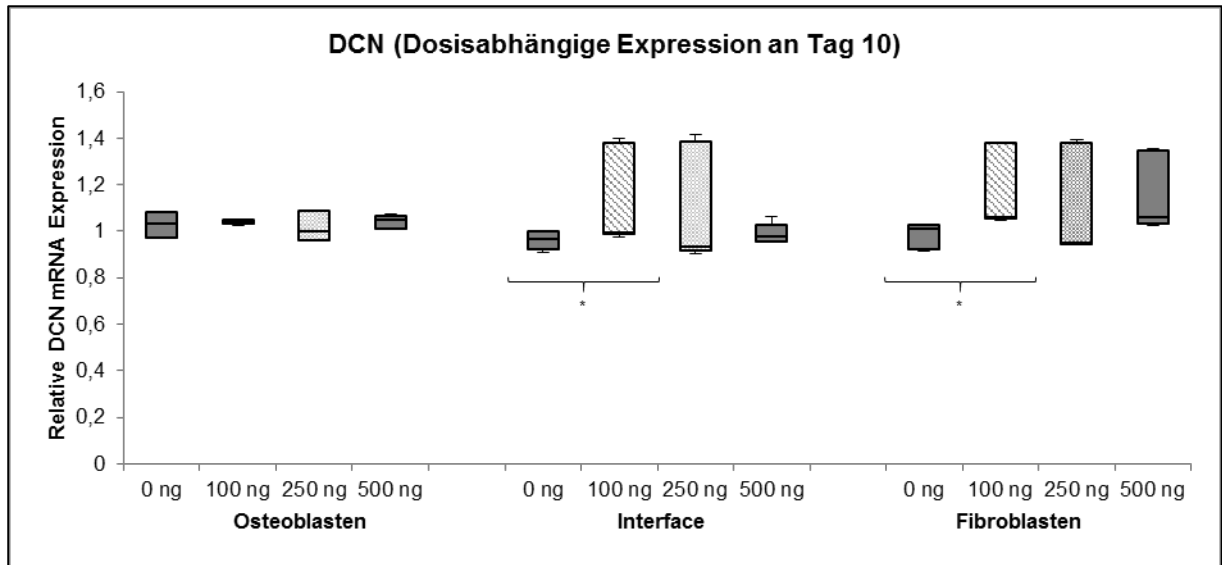


Abbildung 54: Graphische Darstellung der Expression von DCN nach zehn Tagen multipler Stimulation mit BMP7

Mittlerer Querstrich: Median

Oberer und unterer Querstrich: Minimum und Maximum

Obere und untere Begrenzung des Kastens: 25. und 75. Perzentile

* Die Änderung der Expression zwischen diesen Proben ist signifikant ($p < 0,05$)

Tabelle 27: Relative Expression von nach multipler Stimulation mit BMP7

RE DCN nach multipler Stimulation mit BMP7 an Tag 3			
	Präosteoblasten	Intermediärzone	Fibroblasten
0ng/ml			
100ng/ml	1,081	1,037	1,003
250ng/ml	0,998	0,953	0,961
500ng/ml	0,991	0,966	0,929
RE DCN nach multipler Stimulation mit BMP7 an Tag 7			
	Präosteoblasten	Intermediärzone	Fibroblasten
0ng/ml	1,022	0,971	0,939
100ng/ml	1,086	0,968	0,982
250ng/ml	1,008	0,957	0,954
500ng/ml	1,023	0,987	0,963
RE DCN nach multipler Stimulation mit BMP7 an Tag 10			
	Präosteoblasten	Intermediärzone	Fibroblasten
0ng/ml	1,030	0,966	1,009
100ng/ml	1,042	0,993	1,062
250ng/ml	0,999	0,933	0,951
500ng/ml	1,051	0,975	1,060

4.5. Expression von FMOD

4.5.1. Singuläre Stimulation mit BMP2

Im Bereich der Präosteoblasten war die relative Expression von FMOD nach singulärer Stimulation mit BMP2 in allen Proben gesteigert. Am Tag zehn lag die der stimulierten Proben über der der nicht stimulierten. Am Tag sieben zeigten die nicht stimulierten Proben einen 1,220-fachen Anstieg der relativen Expression. Dieser war im Vergleich zu den mit 100ng/ml und 250ng/ml stimulierten Proben am selben Tag signifikant.

In der Intermediärzone war in den stimulierten Proben eine z.T. zeitpunktabhängige Zunahme der Expression, mit signifikanter Änderung dieser zwischen stimulierten und nicht stimulierten Proben am Tag sieben und zehn auszumachen. Am Tag drei zeigten die mit 500ng/ml stimulierten Proben einen deutlichen, 1,240-fachen Anstieg der relativen Expression. Diese Expressionsänderung war zum genannten Zeitpunkt signifikant im Vergleich zu den anderen Proben.

Die relative Expression von FMOD im Bereich der Fibroblasten zeigte einen zeitpunkt- und z.T. auch dosisabhängigen Anstieg in den stimulierten Proben. Am Tag sieben zeigten die mit 500ng/ml stimulierten Proben einen 1,163-fachen, im Vergleich zu den anderen Proben signifikanten Expressionsanstieg. Am Tag zehn waren alle Expressionsänderungen zwischen den stimulierten und den nicht stimulierten Proben signifikant. Hier zeigten insbesondere die mit 250ng/ml stimulierten Proben einen deutlichen, 1,202-fachen Anstieg der relativen Expression.

Zusammenfassend betrachtet zeigte sich in der Intermediärzone eine teilweise zeitpunktabhängige und bei den Fibroblasten eine zeitpunkt- und teilweise dosisabhängige Steigerung der Expression von FMOD. Die Präosteoblasten zeigten bei singulärer Stimulation mit BMP2 einen zeitpunkt- und dosisunabhängigen Anstieg der relativen Expression in allen Proben. (Siehe Abbildungen 54, 55 und 56 sowie Tabelle 28)

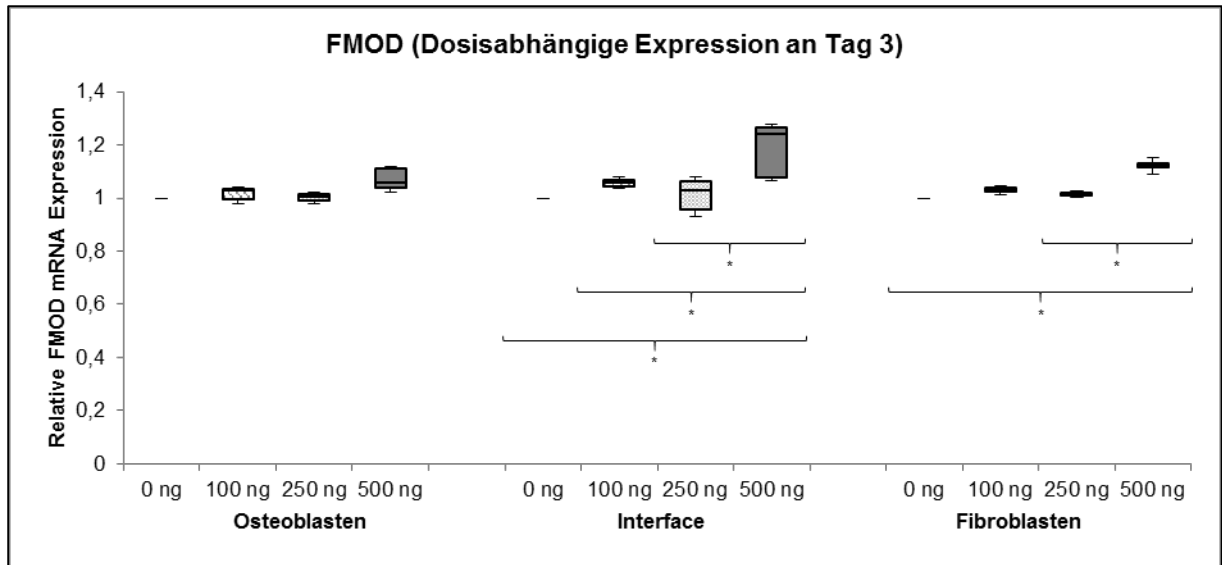


Abbildung 55: Graphische Darstellung der Expression von FMOD nach drei Tagen singulärer Stimulation mit BMP2

Mittlerer Querstrich: Median

Oberer und unterer Querstrich: Minimum und Maximum

Obere und untere Begrenzung des Kastens: 25. und 75. Perzentile

* Die Änderung der Expression zwischen diesen Proben ist signifikant ($p < 0,05$)

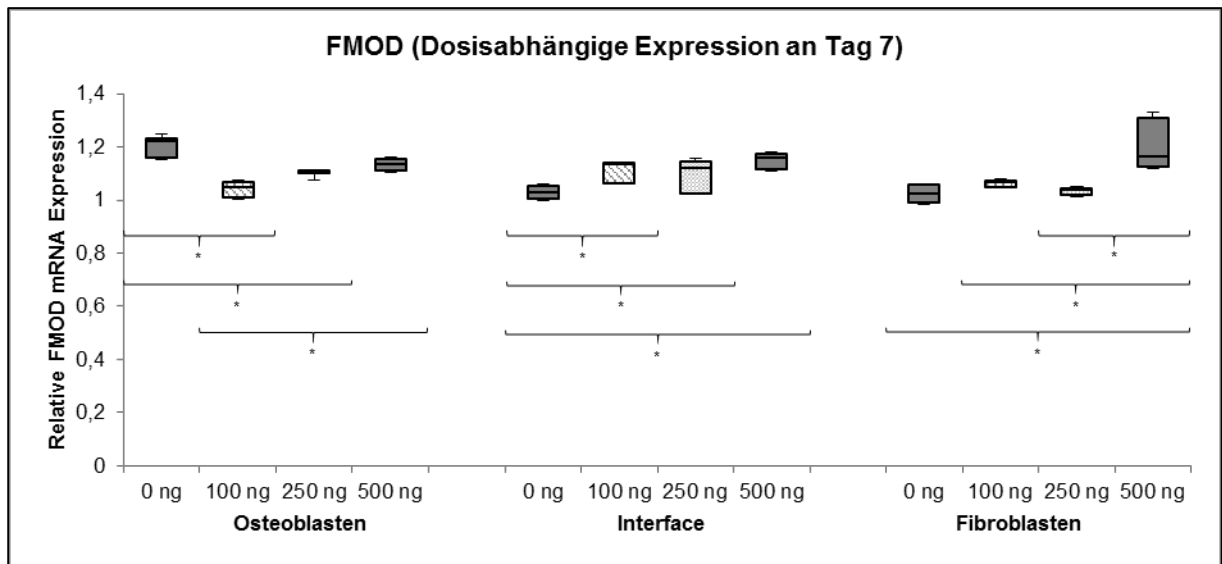


Abbildung 56: Graphische Darstellung der Expression von FMOD nach sieben Tagen singulärer Stimulation mit BMP2

Mittlerer Querstrich: Median

Oberer und unterer Querstrich: Minimum und Maximum

Obere und untere Begrenzung des Kastens: 25. und 75. Perzentile

* Die Änderung der Expression zwischen diesen Proben ist signifikant ($p < 0,05$)

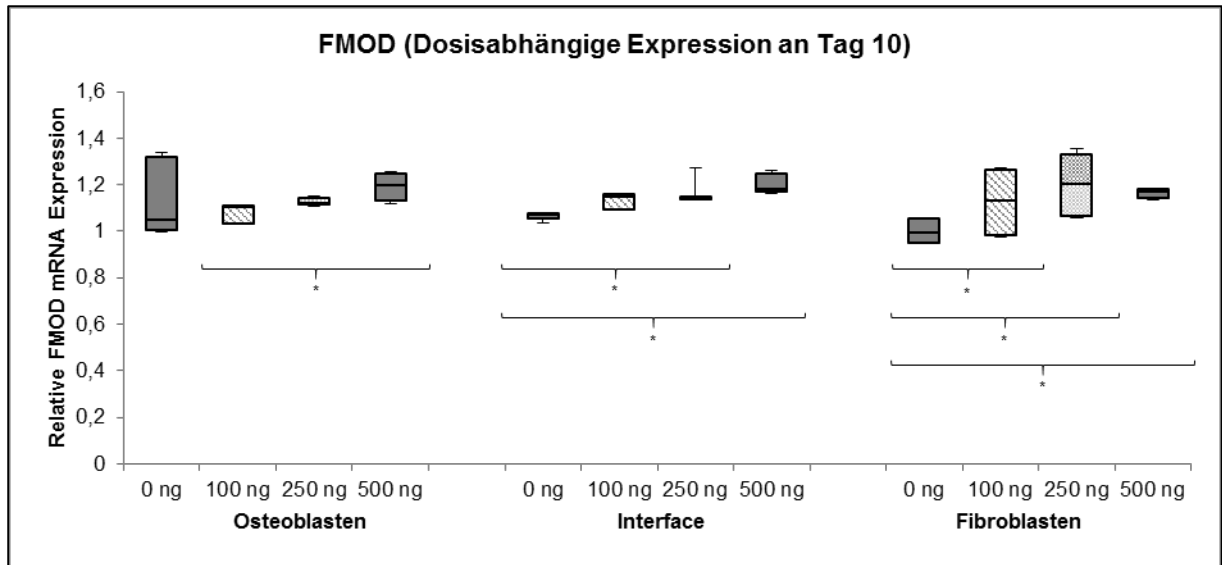


Abbildung 57: Graphische Darstellung der Expression von FMOD nach zehn Tagen singularer Stimulation mit BMP2

Mittlerer Querstrich: Median

Oberer und unterer Querstrich: Minimum und Maximum

Obere und untere Begrenzung des Kastens: 25. und 75. Perzentile

* Die Änderung der Expression zwischen diesen Proben ist signifikant ($p < 0,05$)

Tabelle 28: Relative Expression von nach singulärer Stimulation mit BMP2

RE FMOD nach singulärer Stimulation mit BMP2 an Tag 3			
	Präosteoblasten	Intermediärzone	Fibroblasten
0ng/ml			
100ng/ml	1,027	1,060	1,032
250ng/ml	1,003	1,027	1,014
500ng/ml	1,059	1,240	1,128
RE FMOD nach singulärer Stimulation mit BMP2 an Tag 7			
	Präosteoblasten	Intermediärzone	Fibroblasten
0ng/ml	1,220	1,029	1,025
100ng/ml	1,048	1,136	1,067
250ng/ml	1,104	1,119	1,040
500ng/ml	1,134	1,157	1,163
RE FMOD nach singulärer Stimulation mit BMP2 an Tag 10			
	Präosteoblasten	Intermediärzone	Fibroblasten
0ng/ml	1,049	1,074	0,994
100ng/ml	1,103	1,147	1,131
250ng/ml	1,119	1,144	1,202
500ng/ml	1,198	1,180	1,169

4.5.2. Multiple Stimulation mit BMP2

Im Bereich der Präosteoblasten zeigte die Expression von FMOD nach multipler Stimulation mit BMP2 z.T. reduzierte und z.T. gesteigerte Expressionen unabhängig von Zeitpunkt und Dosis. An Tag zehn war in den mit 100ng/ml stimulierten Proben ein 1,172-facher Anstieg der relativen Expression auszumachen. Dieser war im Vergleich zu den anderen Proben zum genannten Zeitpunkt signifikant.

In der Intermediärzone zeigte sich bei den mit 100ng/ml stimulierten Proben an Tag drei und sieben ein leichter, bei den mit 500ng/ml stimulierten an Tag sieben ein deutlicher, 1,157-facher Anstieg der relativen Expression. Letzterer war im Vergleich zu den nicht stimulierten Proben an Tag sieben signifikant. Die anderen Proben zeigten reduzierte Expressionswerte ohne signifikante Änderungen untereinander.

Im Bereich der Fibroblasten war die relative Expression von FMOD ebenfalls z.T. reduziert und z.T. gesteigert unabhängig von Zeitpunkt und Dosis. An Tag zehn zeigte sich eine deutliche, 0,851-fache Reduktion der relativen Expression in den mit 500ng/ml stimulierten Proben. Diese Expressionsänderung war im Vergleich zu den nicht stimulierten Proben signifikant. Weitere signifikante Expressionsänderungen der Proben untereinander bestanden nicht.

Die multiple Stimulation mit BMP2 hatte zusammengefasst keine eindeutig expressionssteigernde oder hemmende Wirkung auf Präosteoblasten, Fibroblasten und die Intermediärzone. Es fanden sich dosis- und zeitpunkunabhängig reduzierte sowie gesteigerte Expressionen. (Siehe Abbildungen 57, 58 und 59 sowie Tabelle 29)

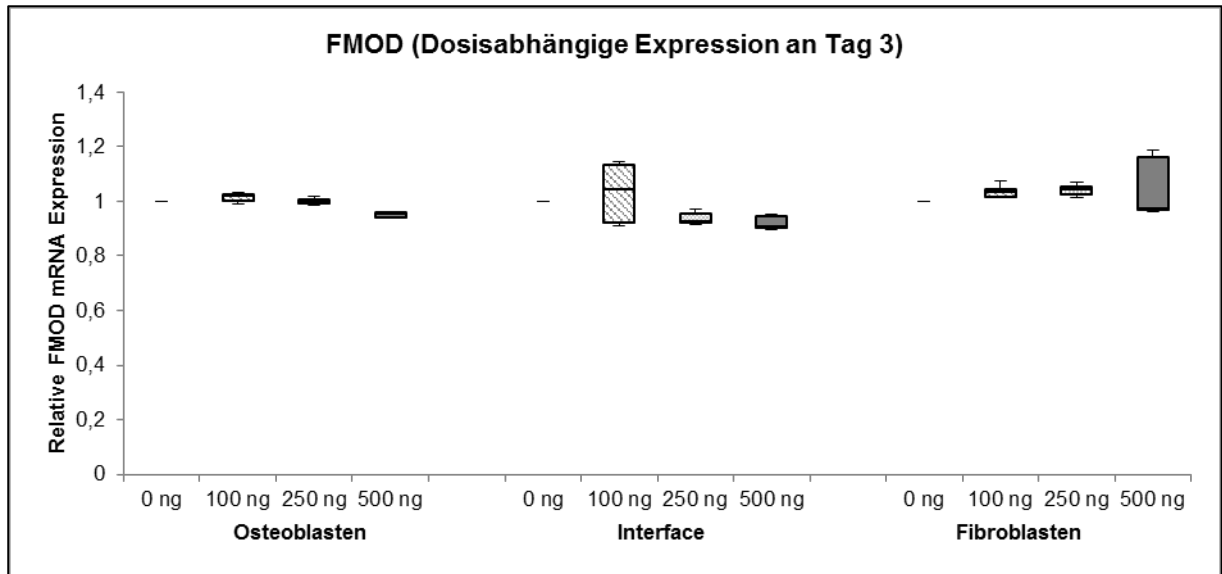


Abbildung 58: Graphische Darstellung der Expression von FMOD nach drei Tagen multipler Stimulation mit BMP2

Mittlerer Querstrich: Median

Oberer und unterer Querstrich: Minimum und Maximum

Obere und untere Begrenzung des Kastens: 25. und 75. Perzentile

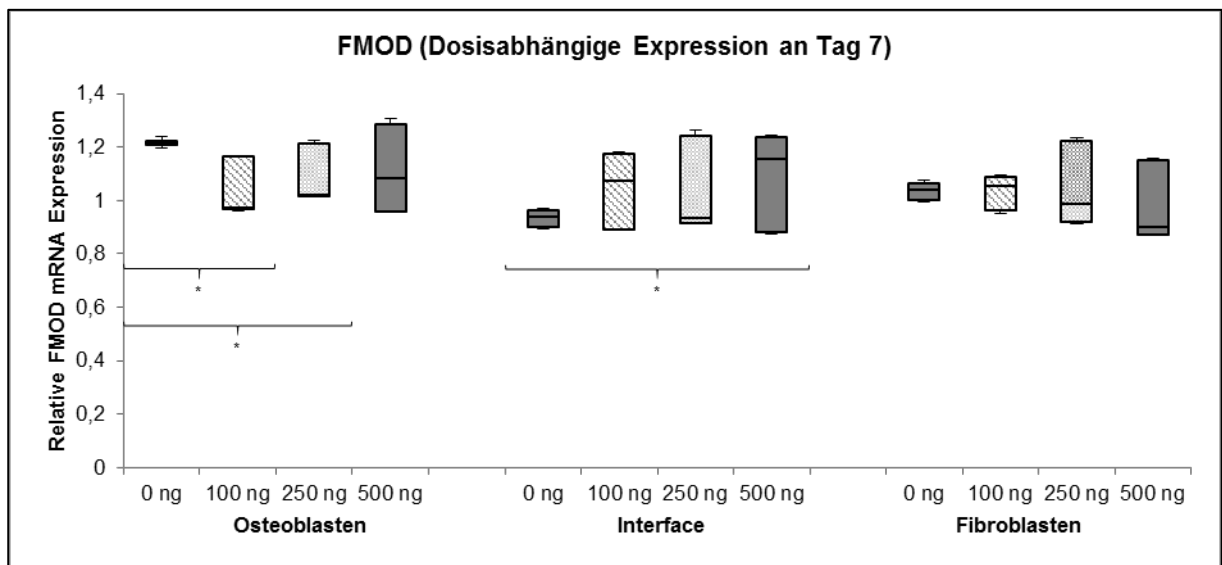


Abbildung 59: Graphische Darstellung der Expression von FMOD nach sieben Tagen multipler Stimulation mit BMP2

Mittlerer Querstrich: Median

Oberer und unterer Querstrich: Minimum und Maximum

Obere und untere Begrenzung des Kastens: 25. und 75. Perzentile

* Die Änderung der Expression zwischen diesen Proben ist signifikant ($p < 0,05$)

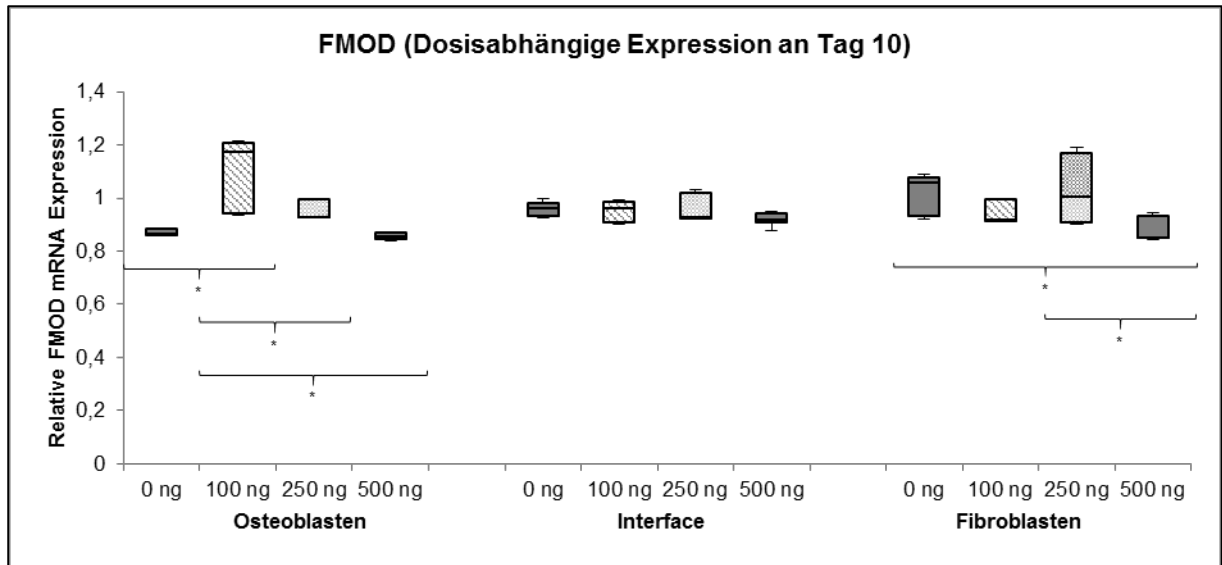


Abbildung 60: Graphische Darstellung der Expression von FMOD nach zehn Tagen multipler Stimulation mit BMP2

Mittlerer Querstrich: Median

Oberer und unterer Querstrich: Minimum und Maximum

Obere und untere Begrenzung des Kastens: 25. und 75. Perzentile

* Die Änderung der Expression zwischen diesen Proben ist signifikant ($p < 0,05$)

Tabelle 29: Relative Expression von nach multipler Stimulation mit BMP2

RE FMOD nach multipler Stimulation mit BMP2 an Tag 3			
	Präosteoblasten	Intermediärzone	Fibroblasten
0ng/ml			
100ng/ml	1,022	1,043	1,037
250ng/ml	0,999	0,927	1,045
500ng/ml	0,954	0,907	0,973
RE FMOD nach multipler Stimulation mit BMP2 an Tag 7			
	Präosteoblasten	Intermediärzone	Fibroblasten
0ng/ml	1,219	0,940	1,038
100ng/ml	0,972	1,073	1,053
250ng/ml	1,023	0,933	0,987
500ng/ml	1,085	1,157	0,900
RE FMOD nach multipler Stimulation mit BMP2 an Tag 10			
	Präosteoblasten	Intermediärzone	Fibroblasten
0ng/ml	0,865	0,964	1,057
100ng/ml	1,172	0,959	0,917
250ng/ml	0,930	0,930	1,006
500ng/ml	0,854	0,919	0,851

4.5.3. Singuläre Stimulation mit BMP7

Die relative Expression von FMOD war im Bereich der Präosteoblasten nach singulärer Stimulation mit BMP7 reduziert, mit Ausnahme der mit 100ng/ml stimulierten an Tag drei. Diese zeigten im Vergleich zu den anderen Proben zum selben Zeitpunkt einen signifikanten, 1,041-fachen Expressionsanstieg. Die Expressionsänderungen der stimulierten Proben waren im Vergleich untereinander zu jedem Zeitpunkt signifikant.

In der Intermediärzone waren die Expressionswerte ebenfalls in fast allen Proben vermindert. An Tag drei zeigten die mit 500ng/ml stimulierten Proben einen im Vergleich zu den mit 250ng/ml stimulierten Proben signifikanten Expressionsanstieg.

Im Bereich der Fibroblasten zeigte sich bei den mit 100ng/ml stimulierten Proben an Tag drei und sieben eine 1,126-fach bzw. 1,054-fach gesteigerte Expression von FMOD, die im Vergleich zu den anderen Proben zum genannten Zeitpunkt signifikant war. Die anderen Proben zeigten reduzierte Expressionswerte. Speziell die mit 250ng/ml und 500ng/ml stimulierten Proben zeigte an Tag sieben eine im Vergleich zu den nicht stimulierten signifikante, 0,798-fache bzw. 0,855-fache Abnahme der relativen Expression.

Zusammenfassend kann man bei der singulären Stimulation mit BMP7 von einer hemmenden Wirkung auf die Expression von FMOD in Präosteoblasten, Fibroblasten und der Intermediärzone sprechen, wobei die mit 100ng/ml stimulierten Proben eine zeitpunktabhängige Steigerung dieser in den Präosteoblasten und Fibroblasten zeigten. (Siehe Abbildungen 60, 61 und 62 sowie Tabelle 30)

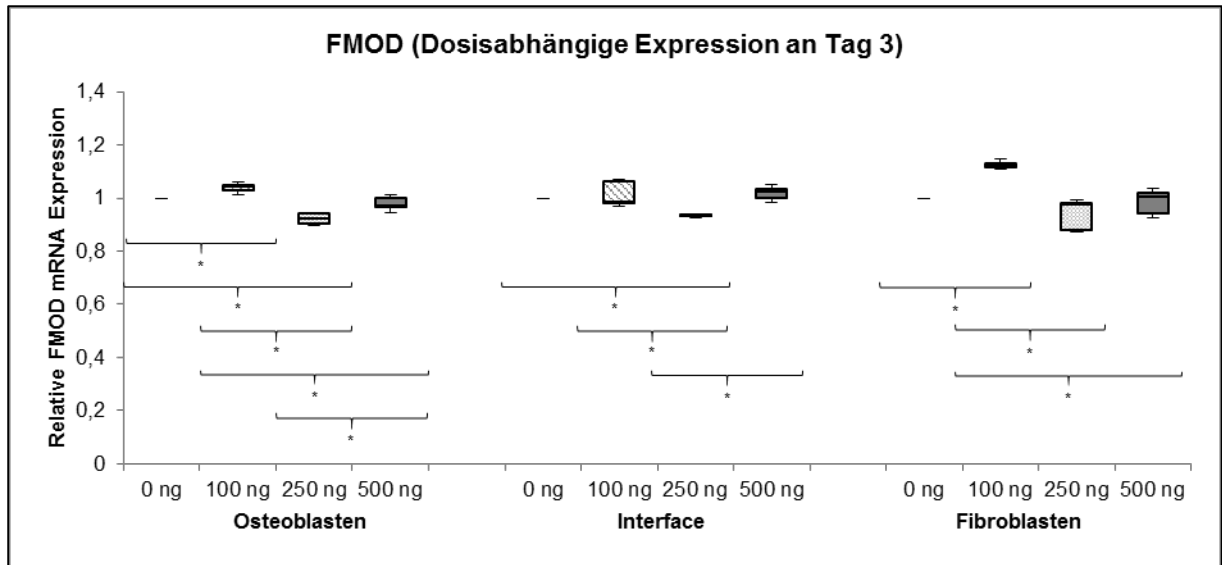


Abbildung 61: Graphische Darstellung der Expression von FMOD nach drei Tagen singulärer Stimulation mit BMP7

Mittlerer Querstrich: Median

Oberer und unterer Querstrich: Minimum und Maximum

Obere und untere Begrenzung des Kastens: 25. und 75. Perzentile

* Die Änderung der Expression zwischen diesen Proben ist signifikant ($p < 0,05$)

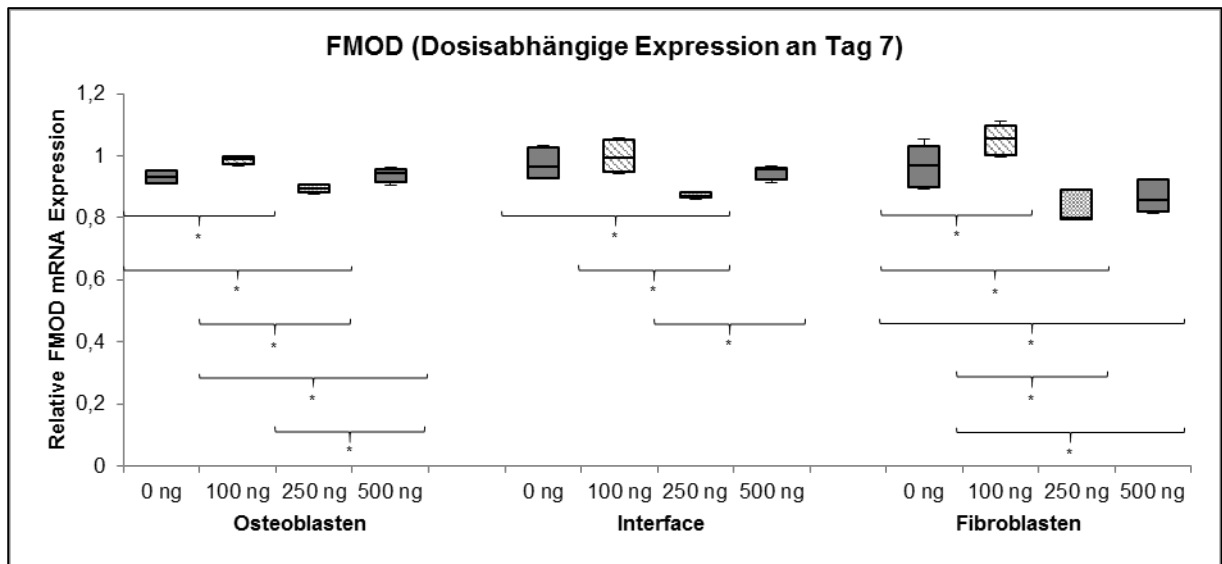


Abbildung 62: Graphische Darstellung der Expression von FMOD nach sieben Tagen singulärer Stimulation mit BMP7

Mittlerer Querstrich: Median

Oberer und unterer Querstrich: Minimum und Maximum

Obere und untere Begrenzung des Kastens: 25. und 75. Perzentile

* Die Änderung der Expression zwischen diesen Proben ist signifikant ($p < 0,05$)

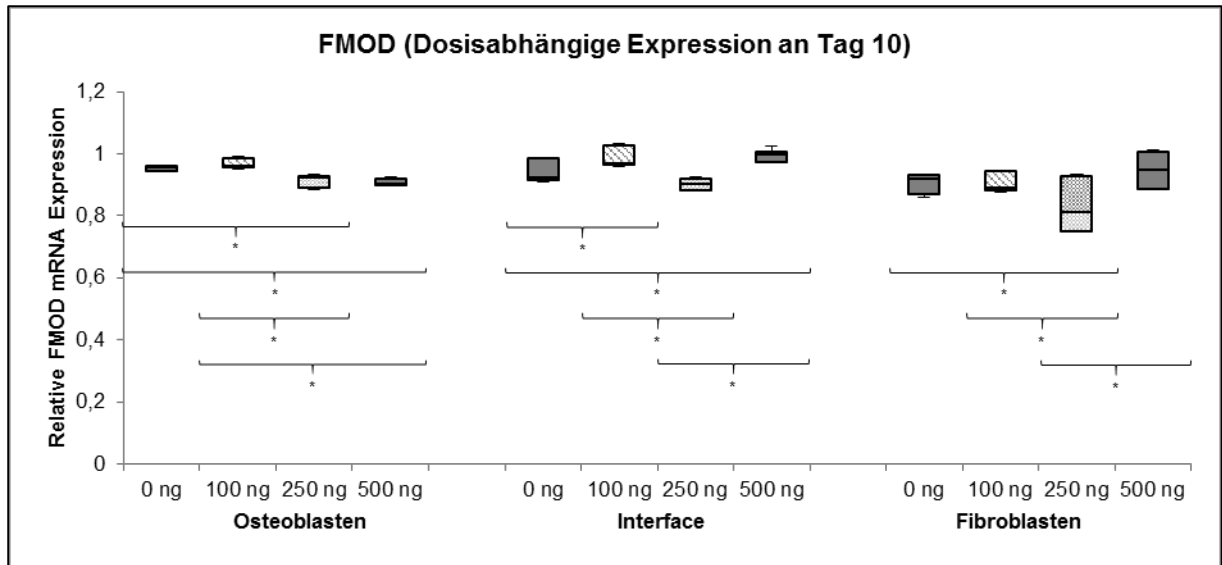


Abbildung 63: Graphische Darstellung der Expression von FMOD nach zehn Tagen singularer Stimulation mit BMP7

Mittlerer Querstrich: Median

Oberer und unterer Querstrich: Minimum und Maximum

Obere und untere Begrenzung des Kastens: 25. und 75. Perzentile

* Die Änderung der Expression zwischen diesen Proben ist signifikant ($p < 0,05$)

Tabelle 30: Relative Expression von FMOD nach singulärer Stimulation mit BMP7

RE FMOD nach singulärer Stimulation mit BMP7 an Tag 3			
	Präosteoblasten	Intermediärzone	Fibroblasten
0ng/ml			
100ng/ml	1,041	0,987	1,126
250ng/ml	0,923	0,933	0,976
500ng/ml	0,972	1,022	1,004
RE FMOD nach singulärer Stimulation mit BMP7 an Tag 7			
	Präosteoblasten	Intermediärzone	Fibroblasten
0ng/ml	0,934	0,963	0,967
100ng/ml	0,989	0,993	1,054
250ng/ml	0,893	0,868	0,798
500ng/ml	0,943	0,957	0,855
RE FMOD nach singulärer Stimulation mit BMP7 an Tag 10			
	Präosteoblasten	Intermediärzone	Fibroblasten
0ng/ml	0,956	0,935	0,925
100ng/ml	0,960	0,940	0,968
250ng/ml	0,923	0,918	0,905
500ng/ml	0,904	0,951	0,997

4.5.4. Multiple Stimulation mit BMP7

Im Bereich der Präosteoblasten war die Expression von FMOD durch die multiple Stimulation mit BMP7 in den mit 100ng/ml und 500ng/ml stimulierten Proben zu jedem Zeitpunkt erhöht. An Tag sieben waren diese Expressionsanstiege im Vergleich zu den nicht stimulierten Proben signifikant. Die mit 250ng/ml stimulierten Proben zeigten zeitpunktunabhängig reduzierte Expressionswerte.

In der Intermediärzone waren keine signifikanten Änderungen der Expression auszumachen. Die Expressionswerte der stimulierten Proben waren zumeist reduziert oder lagen unter denen der nicht stimulierten Proben. Eine Ausnahme bildeten die mit 500ng/ml stimulierten Proben an Tag sieben und zehn.

Im Bereich der Fibroblasten war die Expression von FMOD in den stimulierten Proben meist reduziert. An Tag sieben war diese Abnahme der relativen Expression in den mit 250ng/ml und 500ng/ml stimulierten Proben signifikant im Vergleich zu den nicht stimulierten Proben. An Tag zehn zeigten die mit 500ng/ml stimulierten im Vergleich zu den nicht Stimulierten einen signifikanten, 1,011-fachen Anstieg der Expression.

Zusammengefasst zeigt sich eine dosisabhängige Expressionssteigerung in den Präosteoblasten. In der Intermediärzone und auf Fibroblasten war eine eher hemmende Wirkung auf die Expression auszumachen, wobei eine hohe Wirkstoffkonzentration (500ng/ml) nach langer Stimulation (Tag zehn) in den Fibroblasten einen expressionssteigernden Effekt zeigte. (Siehe Abbildungen 63, 64 und 65 sowie Tabelle 31)

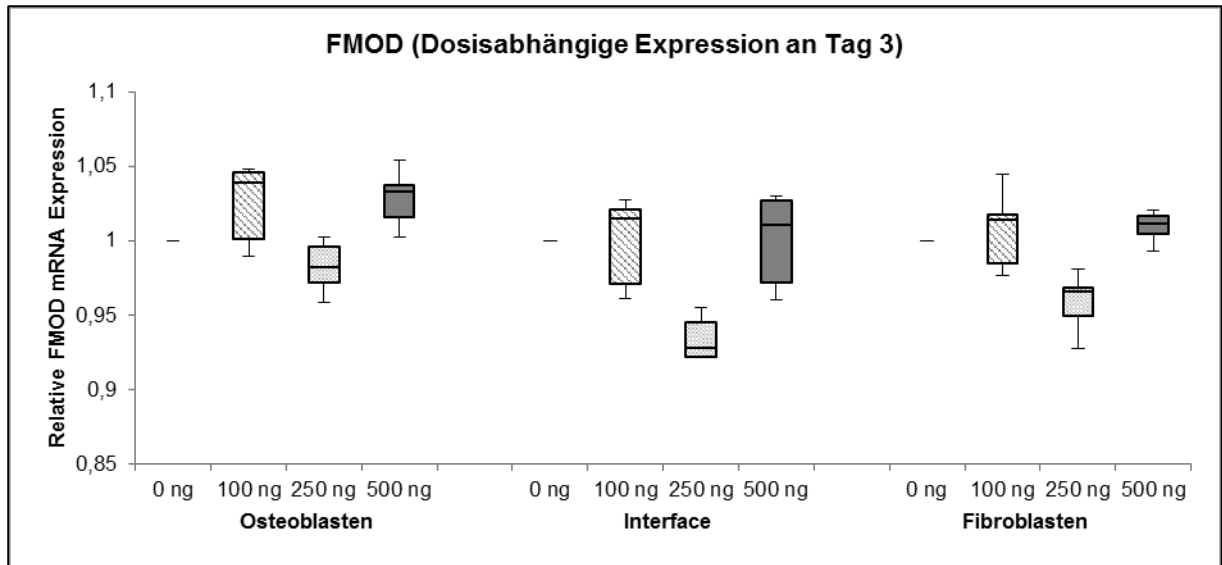


Abbildung 64: Graphische Darstellung der Expression von FMOD nach drei Tagen multipler Stimulation mit BMP7

Mittlerer Querstrich: Median

Oberer und unterer Querstrich: Minimum und Maximum

Obere und untere Begrenzung des Kastens: 25. und 75. Perzentile

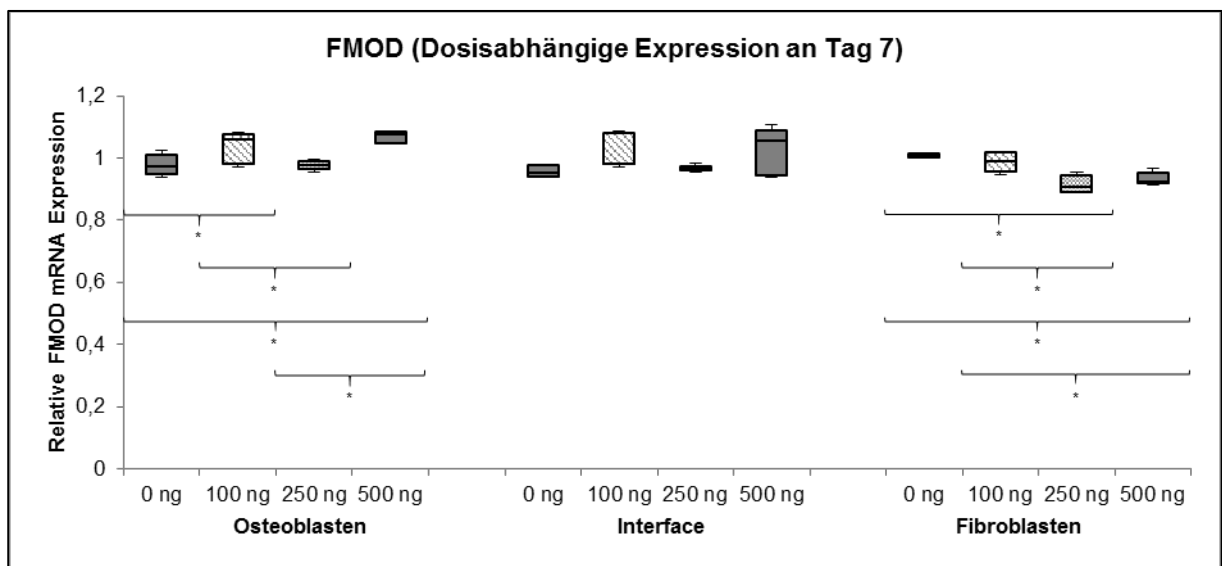


Abbildung 65: Graphische Darstellung der Expression von FMOD nach sieben Tagen multipler Stimulation mit BMP7

Mittlerer Querstrich: Median

Oberer und unterer Querstrich: Minimum und Maximum

Obere und untere Begrenzung des Kastens: 25. und 75. Perzentile

* Die Änderung der Expression zwischen diesen Proben ist signifikant ($p < 0,05$)

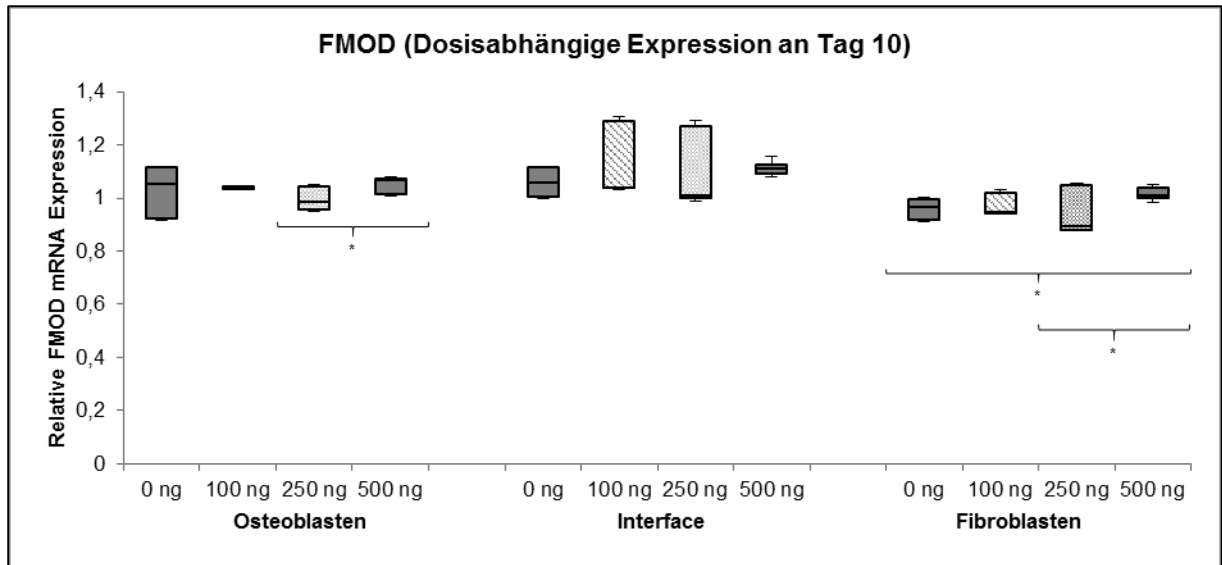


Abbildung 66: Graphische Darstellung der Expression von FMOD nach zehn Tagen multipler Stimulation mit BMP7

Mittlerer Querstrich: Median

Oberer und unterer Querstrich: Minimum und Maximum

Obere und untere Begrenzung des Kastens: 25. und 75. Perzentile

* Die Änderung der Expression zwischen diesen Proben ist signifikant ($p < 0,05$)

Tabelle 31: Relative Expression von FMOD nach multipler Stimulation mit BMP7

RE FMOD nach multipler Stimulation mit BMP7 an Tag 3			
	Präosteoblasten	Intermediärzone	Fibroblasten
0ng/ml			
100ng/ml	1,039	1,015	1,014
250ng/ml	0,982	0,928	0,966
500ng/ml	1,033	1,010	1,011
RE FMOD nach multipler Stimulation mit BMP7 an Tag 7			
	Präosteoblasten	Intermediärzone	Fibroblasten
0ng/ml	0,975	0,951	1,010
100ng/ml	1,059	0,981	0,988
250ng/ml	0,976	0,969	0,908
500ng/ml	1,076	1,054	0,924
RE FMOD nach multipler Stimulation mit BMP7 an Tag 10			
	Präosteoblasten	Intermediärzone	Fibroblasten
0ng/ml	1,052	1,060	0,967
100ng/ml	1,037	1,040	0,946
250ng/ml	0,985	1,007	0,895
500ng/ml	1,069	1,111	1,011

4.6. Expression von MKX

4.6.1. Singuläre Stimulation mit BMP2

Im Bereich der Präosteoblasten war die Expression von MKX durch die singuläre Stimulation dosis- und zeitabhängig gesteigert, wobei die Expression der stimulierten erst an Tag zehn über der der nicht stimulierten Proben lag. Die mit 500ng/ml stimulierten Proben zeigten an Tag zehn einen deutlichen, 1,174-fachen Anstieg der relativen Expression. Dieser war im Vergleich zu den anderen stimulierten Proben zum genannten Zeitpunkt signifikant.

In der Intermediärzone zeigten die mit 250ng/ml und 500ng/ml stimulierten Proben zu jedem Zeitpunkt eine gesteigerte, relative Expression. Diese Expressionsänderungen der mit 500ng/ml stimulierten Proben war im Vergleich zu den nicht stimulierten zu jedem Zeitpunkt, die der mit 250ng/ml stimulierten an Tag drei und sieben signifikant.

Die Expression von MKX im Bereich der Fibroblasten war in allen Proben gesteigert. An Tag drei zeigten die mit 500ng/ml stimulierten Proben einen 1,159-fachen, an Tag sieben einen 1,188-fachen und an Tag zehn einen 1,166-fachen Anstieg der relativen Expression. Die Expressionsanstiege an Tag drei und sieben waren im Vergleich zu allen anderen Proben, der an Tag zehn im Vergleich zu den nicht stimulierten Proben signifikant. Die relative Expression von MKX war in den mit 250ng/ml stimulierten Proben an Tag zehn im Vergleich zu den nicht stimulierten Proben signifikant um das 1,211-fache gesteigert.

Zusammenfassend scheint sich die singuläre Stimulation mit BMP2 steigernd auf die Expression vom MKX sowohl in Fibroblasten, Präosteoblasten und in der Intermediärzone auszuwirken. (Siehe Abbildungen 66, 67 und 68 sowie Tabelle 32)

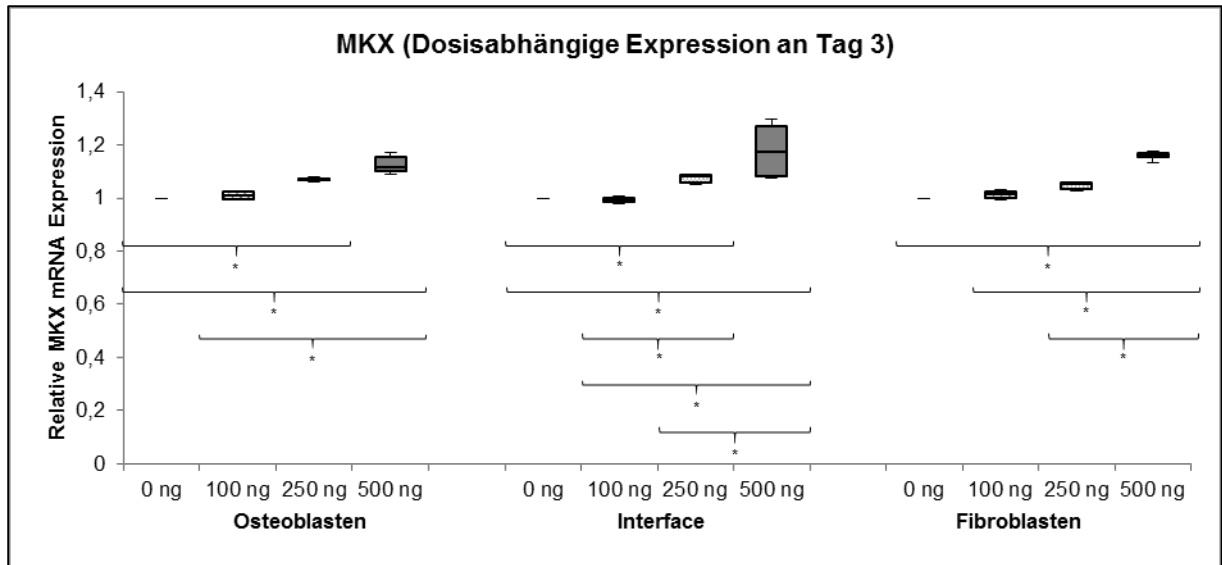


Abbildung 67: Graphische Darstellung der Expression von MKX nach drei Tagen singulärer Stimulation mit BMP2

Mittlerer Querstrich: Median

Oberer und unterer Querstrich: Minimum und Maximum

Obere und untere Begrenzung des Kastens: 25. und 75. Perzentile

* Die Änderung der Expression zwischen diesen Proben ist signifikant ($p < 0,05$)

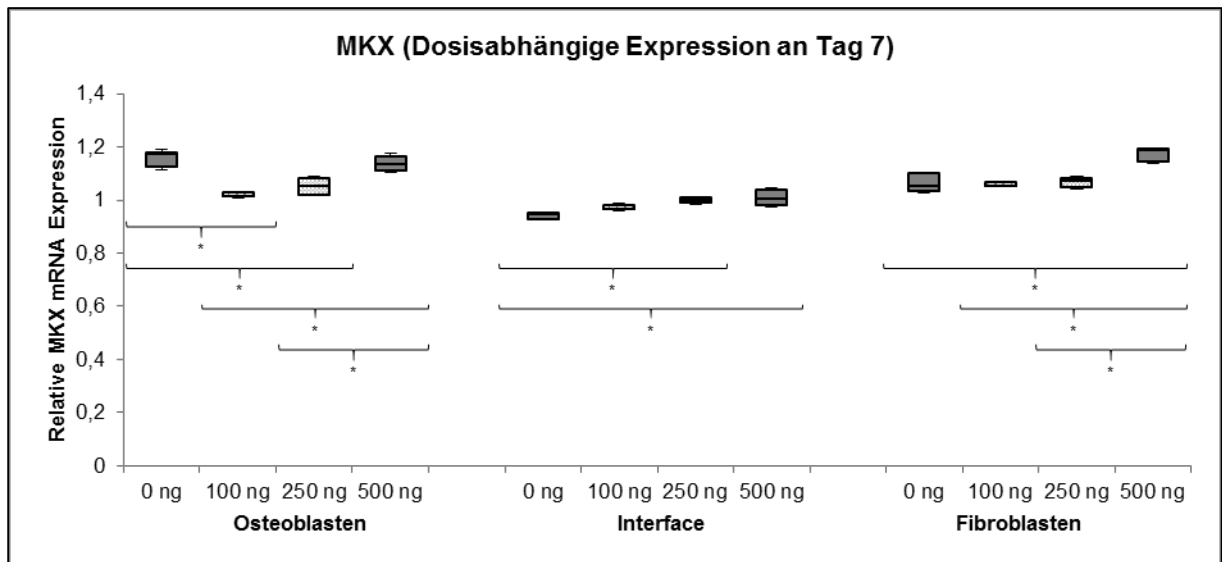


Abbildung 68: Graphische Darstellung der Expression von MKX nach sieben Tagen singulärer Stimulation mit BMP2

Mittlerer Querstrich: Median

Oberer und unterer Querstrich: Minimum und Maximum

Obere und untere Begrenzung des Kastens: 25. und 75. Perzentile

* Die Änderung der Expression zwischen diesen Proben ist signifikant ($p < 0,05$)

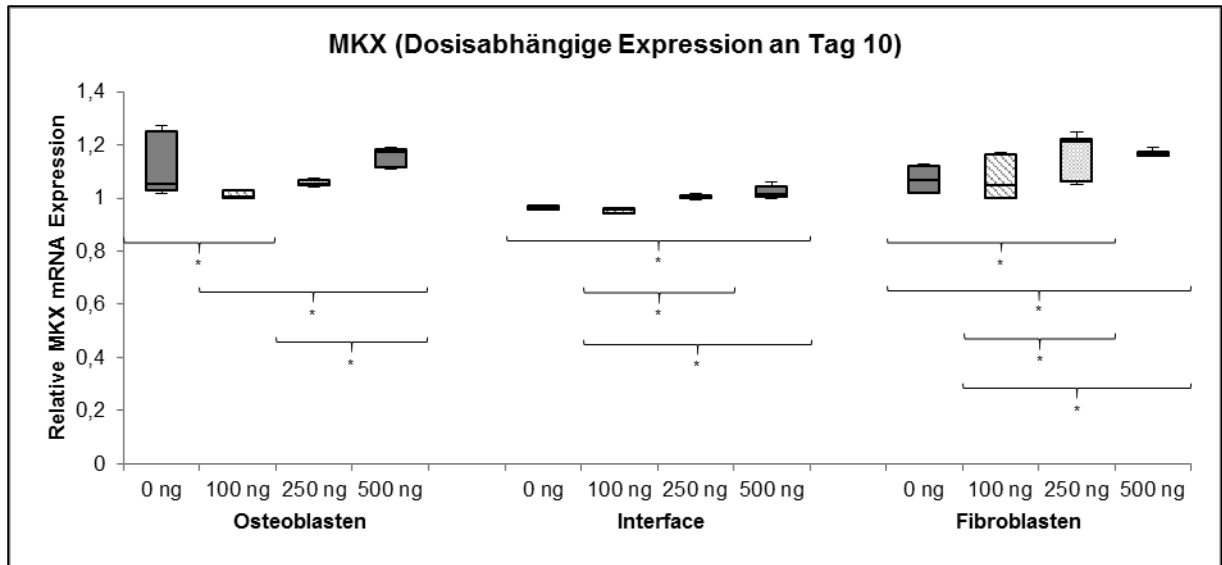


Abbildung 69: Graphische Darstellung der Expression von MKX nach zehn Tagen singulärer Stimulation mit BMP2

Mittlerer Querstrich: Median

Oberer und unterer Querstrich: Minimum und Maximum

Obere und untere Begrenzung des Kastens: 25. und 75. Perzentile

* Die Änderung der Expression zwischen diesen Proben ist signifikant ($p < 0,05$)

Tabelle 32: Relative Expression von MKX nach singulärer Stimulation mit BMP2

RE MKX nach singulärer Stimulation mit BMP2 an Tag 3			
	Präosteoblasten	Intermediärzone	Fibroblasten
0ng/ml			
100ng/ml	1,010	0,988	1,014
250ng/ml	1,068	1,080	1,053
500ng/ml	1,118	1,173	1,159
RE MKX nach singulärer Stimulation mit BMP2 an Tag 7			
	Präosteoblasten	Intermediärzone	Fibroblasten
0ng/ml	1,173	0,949	1,054
100ng/ml	1,017	0,965	1,055
250ng/ml	1,052	1,002	1,072
500ng/ml	1,133	1,005	1,188
RE MKX nach singulärer Stimulation mit BMP2 an Tag 10			
	Präosteoblasten	Intermediärzone	Fibroblasten
0ng/ml	1,052	0,963	1,065
100ng/ml	1,005	0,956	1,049
250ng/ml	1,054	1,003	1,211
500ng/ml	1,174	1,014	1,166

4.6.2. Multiple Stimulation mit BMP2

Nach multipler Stimulation mit BMP2 war die relative Expression von MKX in den stimulierten Proben reduziert oder im Vergleich zu den nicht stimulierten Proben zum selben Zeitpunkt geringer gesteigert. Eine Ausnahme waren hier die mit 100ng/ml stimulierten Proben an Tag zehn, die einen deutlichen, 1,173-fachen Anstieg der Expression zeigten. Dieser war im Vergleich zu den anderen Proben zum genannten Zeitpunkt signifikant. An Tag sieben zeigten die nicht stimulierten Proben einen ebenfalls deutlichen 1,299-fachen Expressionsanstieg. Dieser war im Vergleich zu den stimulierten Proben signifikant.

In der Intermediärzone zeigten die mit 250ng/ml stimulierten Proben zu jedem Zeitpunkt und die mit 100ng/ml stimulierten an Tag zehn reduzierte Expressionswerte. Keine dieser Expressionsänderungen war im Vergleich zu den anderen Proben zum jeweiligen Zeitpunkt signifikant. Die mit 500ng/ml stimulierten Proben zeigten zu jedem Zeitpunkt und die mit 100ng/ml stimulierten an Tag drei und sieben erhöhte Expressionswerte. An Tag sieben zeigten die mit 100ng/ml und 500ng/ml stimulierten Proben einen im Vergleich zu den nicht stimulierten Proben signifikanten, 1,079-fachen bzw. 1,121-fachen Anstieg der relativen Expression.

Im Bereich der Fibroblasten waren die Expressionswerte der stimulierten Proben niedriger als die der nicht stimulierten Proben zum selben Zeitpunkt oder reduziert. Die nicht stimulierten Proben zeigten einen Anstieg der Expression im zeitlichen Verlauf. An Tag zehn kam es in den nicht stimulierten Proben zu einem 1,178-fachen Anstieg der relativen Expression. Dieser war im Vergleich zu den mit 100ng/ml und 500ng/ml stimulierten Proben zum genannten Zeitpunkt signifikant.

Zusammenfassend betrachtet wirkt sich die multiple Stimulation mit BMP2 eher hemmend auf die Expression von MKX durch Osteoblasten und Fibroblasten aus. In der Intermediärzone zeigte sich dosis- und zeitpunktabhängig eine z.T. gesteigerte, z.T. eine reduzierte Expression. (Siehe Abbildungen 69, 70 und 71 sowie Tabelle 33)

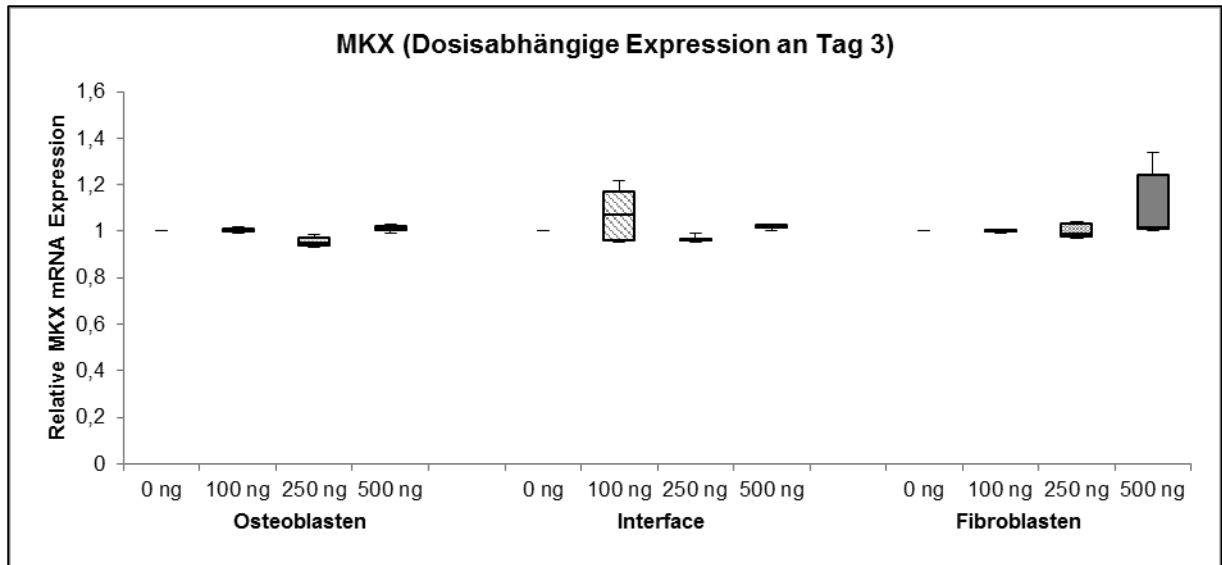


Abbildung 70: Graphische Darstellung der Expression von MKX nach drei Tagen multipler Stimulation mit BMP2

Mittlerer Querstrich: Median

Oberer und unterer Querstrich: Minimum und Maximum

Obere und untere Begrenzung des Kastens: 25. und 75. Perzentile

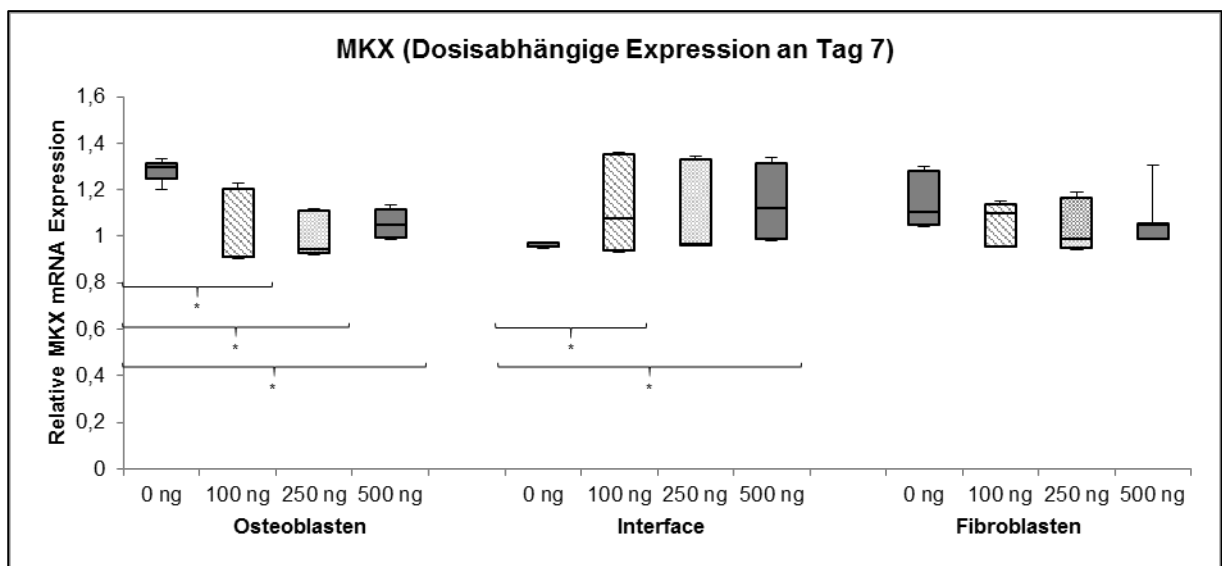


Abbildung 71: Graphische Darstellung der Expression von MKX nach sieben Tagen multipler Stimulation mit BMP2

Mittlerer Querstrich: Median

Oberer und unterer Querstrich: Minimum und Maximum

Obere und untere Begrenzung des Kastens: 25. und 75. Perzentile

* Die Änderung der Expression zwischen diesen Proben ist signifikant ($p < 0,05$)

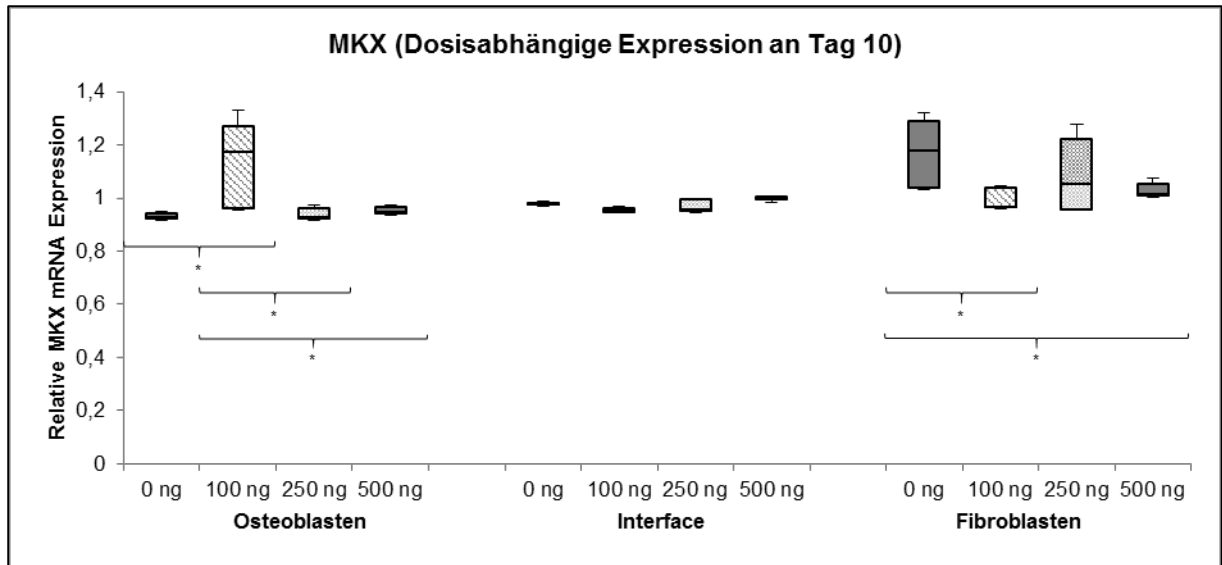


Abbildung 72: Graphische Darstellung der Expression von MKX nach zehn Tagen multipler Stimulation mit BMP2

Mittlerer Querstrich: Median

Oberer und unterer Querstrich: Minimum und Maximum

Obere und untere Begrenzung des Kastens: 25. und 75. Perzentile

* Die Änderung der Expression zwischen diesen Proben ist signifikant ($p < 0,05$)

Tabelle 33: Relative Expression von MKX nach multipler Stimulation mit BMP2

RE MKX nach multipler Stimulation mit BMP2 an Tag 3			
	Präosteoblasten	Intermediärzone	Fibroblasten
0ng/ml			
100ng/ml	1,007	1,070	0,999
250ng/ml	0,952	0,961	0,990
500ng/ml	1,017	1,020	1,018
RE MKX nach multipler Stimulation mit BMP2 an Tag 7			
	Präosteoblasten	Intermediärzone	Fibroblasten
0ng/ml	1,299	0,955	1,106
100ng/ml	0,914	1,079	1,099
250ng/ml	0,946	0,964	0,987
500ng/ml	1,050	1,121	1,052
RE MKX nach multipler Stimulation mit BMP2 an Tag 10			
	Präosteoblasten	Intermediärzone	Fibroblasten
0ng/ml	0,929	0,976	1,178
100ng/ml	1,173	0,956	0,967
250ng/ml	0,930	0,956	1,052
500ng/ml	0,947	1,002	1,014

4.6.3. Singuläre Stimulation mit BMP7

Die relative Expression von MKX war im Bereich der Präosteoblasten nach singulärer Stimulation mit BMP7 bei den mit 100ng/ml und 250ng/ml stimulierten Proben, im Vergleich zu den anderen Proben zum selben Zeitpunkt signifikant gesteigert. Im Zeitlichen Verlauf war bei den mit 100ng/ml stimulierten Proben eine Abnahme der gesteigerten Expressionswerte zu beobachten. So waren die mit 100ng/ml stimulierten Proben an Tag drei um das 1,027-fache, an Tag sieben um das 1,017-fache und an Tag zehn um das 1,006-fache gesteigert. Die nicht und mit 500ng/ml stimulierten Proben zeigten eine Abnahme der Expression. Diese Expressionsänderungen waren im Vergleich zu den anderen Proben zum selben Zeitpunkt ebenfalls signifikant.

In der Intermediärzone zeigten die stimulierten Proben erhöhte Expressionswerte. Die Expressionsänderungen der mit 250ng/ml stimulierten Proben waren zu jedem Zeitpunkt, die der anderen stimulierten Proben an Tag zehn signifikant im Vergleich zu den nicht stimulierten Proben.

Im Bereich der Fibroblasten war die Expression von MKX in den mit 100ng/ml und 250ng/ml stimulierten Proben ebenfalls zu jedem Zeitpunkt gesteigert. Diese Expressionsänderungen waren an Tag drei zu den mit 500ng/ml stimulierten Proben signifikant. An Tag sieben war die der mit 100ng/ml stimulierten Proben zu allen anderen und an Tag zehn die der mit 250ng/ml stimulierten Proben im Vergleich zu den nicht stimulierten signifikant. Die nicht und mit 500ng/ml stimulierten Proben zeigten reduzierte Expressionswerte.

Zusammengefasst hat die singuläre Stimulation mit BMP7, in gewissen Konzentrationen, eine steigernde Wirkung auf die Expression von MKX in allen Bereichen. Dieser Steigerung war speziell im Bereich der Osteoblasten signifikant. (Siehe Abbildungen 72, 73 und 74 sowie Tabelle 34)

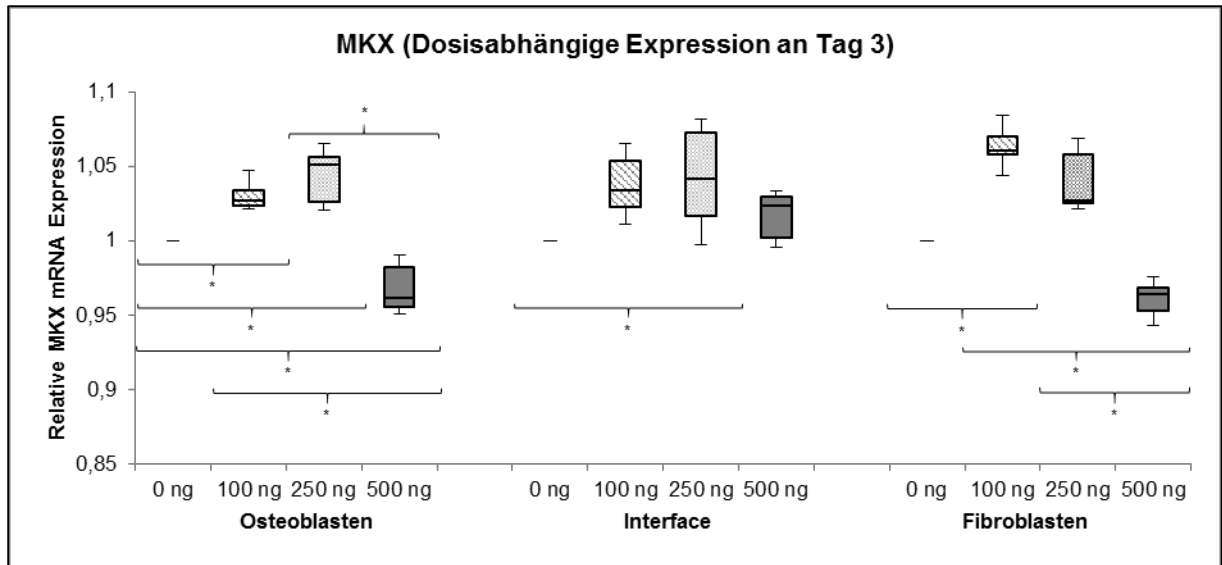


Abbildung 73: Graphische Darstellung der Expression von MKX nach drei Tagen singulärer Stimulation mit BMP7

Mittlerer Querstrich: Median

Oberer und unterer Querstrich: Minimum und Maximum

Obere und untere Begrenzung des Kastens: 25. und 75. Perzentile

* Die Änderung der Expression zwischen diesen Proben ist signifikant ($p < 0,05$)

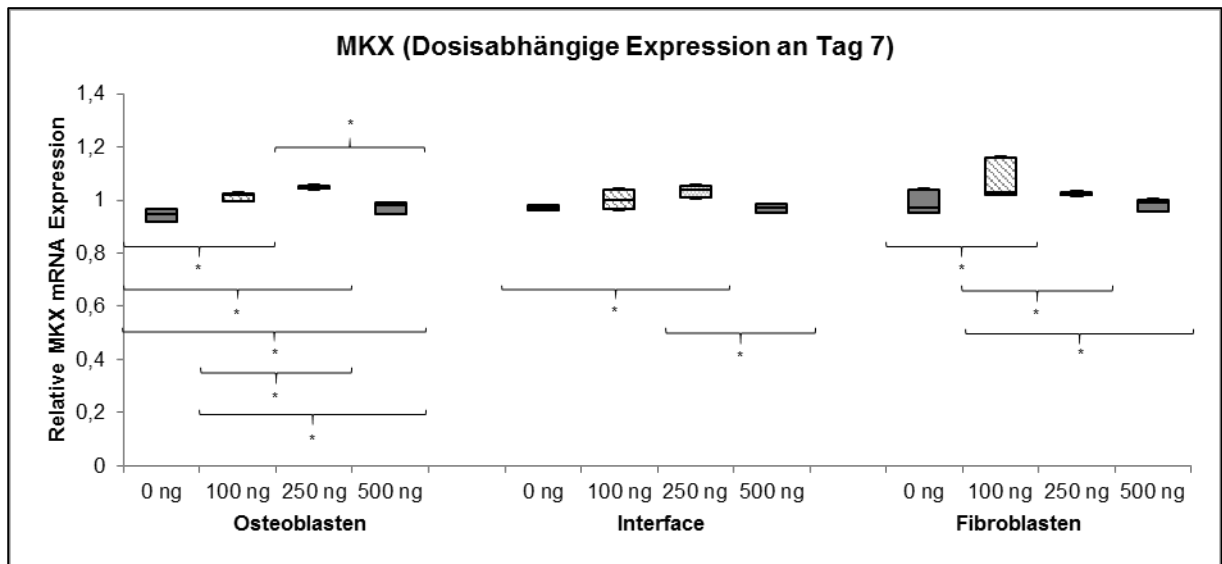


Abbildung 74: Graphische Darstellung der Expression von MKX nach sieben Tagen singulärer Stimulation mit BMP7

Mittlerer Querstrich: Median

Oberer und unterer Querstrich: Minimum und Maximum

Obere und untere Begrenzung des Kastens: 25. und 75. Perzentile

* Die Änderung der Expression zwischen diesen Proben ist signifikant ($p < 0,05$)

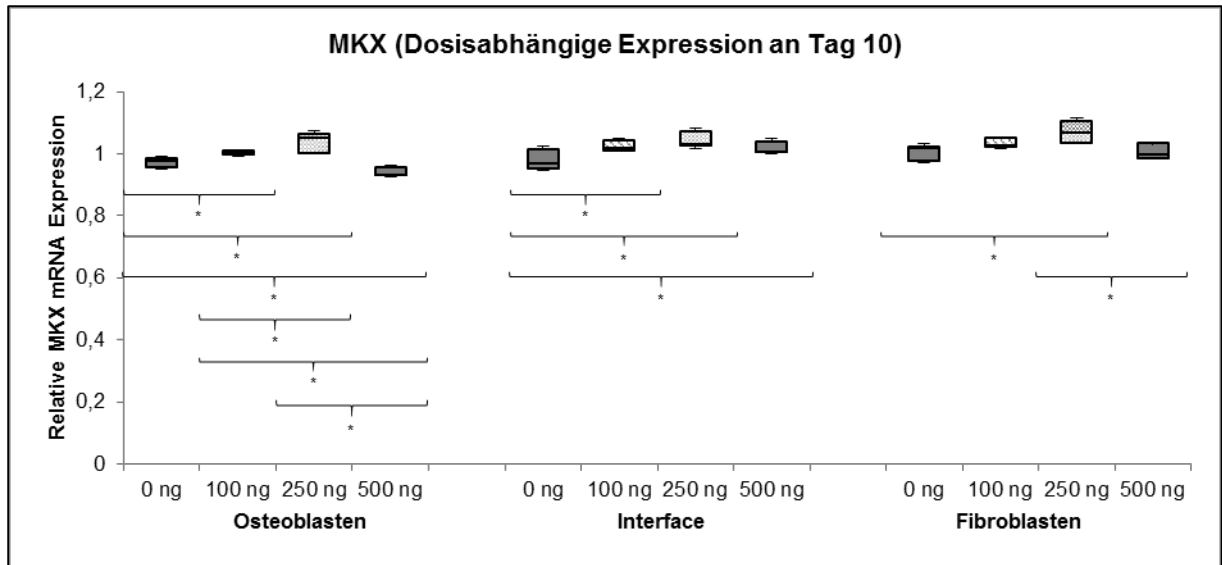


Abbildung 75: Graphische Darstellung der Expression von MKX nach zehn Tagen singulärer Stimulation mit BMP7

Mittlerer Querstrich: Median

Oberer und unterer Querstrich: Minimum und Maximum

Obere und untere Begrenzung des Kastens: 25. und 75. Perzentile

* Die Änderung der Expression zwischen diesen Proben ist signifikant ($p < 0,05$)

Tabelle 34: Relative Expression von MKX nach singulärer Stimulation mit BMP7

RE MKX nach singulärer Stimulation mit BMP7 an Tag 3			
	Präosteoblasten	Intermediärzone	Fibroblasten
0ng/ml			
100ng/ml	1,027	1,034	1,061
250ng/ml	1,051	1,042	1,027
500ng/ml	0,961	1,024	0,964
RE MKX nach singulärer Stimulation mit BMP7 an Tag 7			
	Präosteoblasten	Intermediärzone	Fibroblasten
0ng/ml	0,947	0,972	0,972
100ng/ml	1,017	1,001	1,028
250ng/ml	1,045	1,038	1,019
500ng/ml	0,980	0,973	0,990
RE MKX nach singulärer Stimulation mit BMP7 an Tag 10			
	Präosteoblasten	Intermediärzone	Fibroblasten
0ng/ml	0,977	0,969	1,018
100ng/ml	1,006	1,019	1,027
250ng/ml	1,050	1,029	1,067
500ng/ml	0,933	1,005	0,998

4.6.4. Multiple Stimulation mit BMP7

Die relative Expression von MKX war im Bereich der Präosteoblasten durch die multiple Stimulation mit BMP7 in den mit 100ng/ml stimulierten Proben an Tag drei und sieben um das 1,045-fache bzw. 1,092-fache gesteigert. Diese Expressionsanstiege lagen über dem der nicht stimulierten Proben zum entsprechenden Zeitpunkt und waren im Vergleich zu den anderen Proben signifikant. Die anderen stimulierten Proben zeigten erhöhte Expressionswerte, die aber unter denen der nicht stimulierten Proben zum jeweiligen Zeitpunkt lagen. Diese Änderungen der Expression zeigten keine Signifikanz im Vergleich zu anderen Proben.

In der Intermediärzone zeigten die mit 100ng/ml stimulierten Proben an Tag drei sowie die mit 500ng/ml stimulierten an Tag sieben im Vergleich zu den anderen nicht signifikant gesteigerte Expressionswerte. Die anderen Proben zeigten eine reduzierte Expression. An Tag drei zeigte sich bei den mit 250ng/ml stimulierten Proben eine 0,925-fach reduzierte relative Expression, die gegenüber den nicht stimulierten Proben signifikant war.

Im Bereich der Fibroblasten war die Expression von MKX in allen Proben an Tag drei und sieben reduziert. Es bestanden zeitpunktunabhängig keine signifikanten Expressionsänderungen zwischen den Proben. An Tag zehn zeigten die mit 100ng/ml und 500ng/ml stimulierten Proben einen, gegenüber den anderen Proben nicht signifikanten Anstieg der Expression.

Die multiple Stimulation mit BMP7 hat zusammengefasst eine expressionssteigernde Wirkung, mit signifikanter Steigerung der Expression von MKX bei einigen Proben im Bereich der Osteoblasten und einen eher hemmenden Einfluss auf die Expression in Fibroblasten und in der Intermediärzone. (Siehe Abbildungen 75, 76 und 77 sowie Tabelle 35)

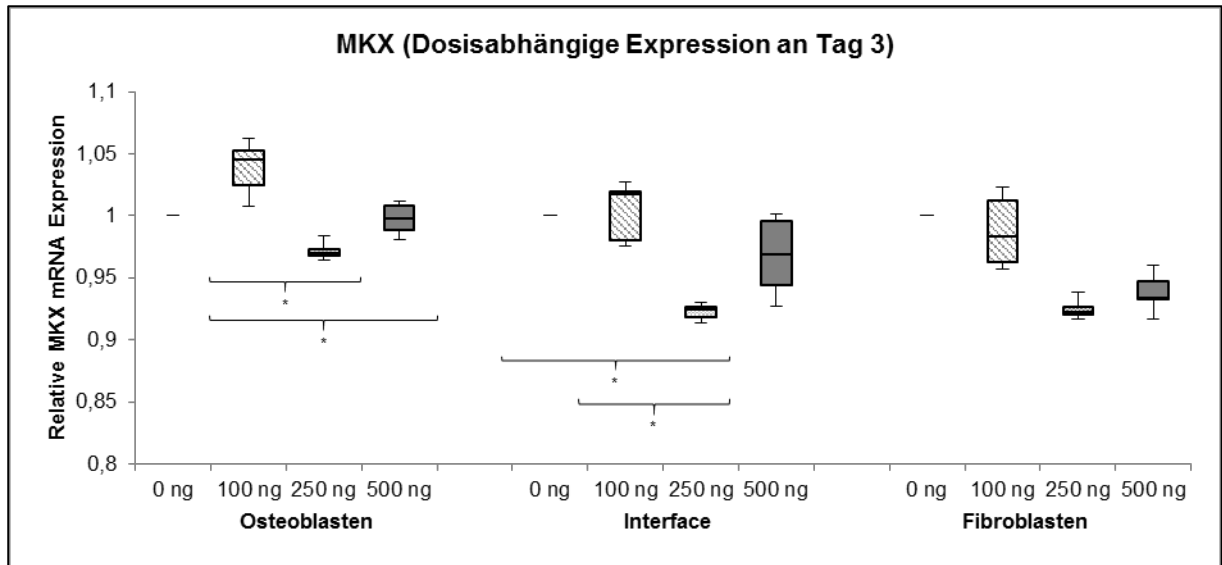


Abbildung 76: Graphische Darstellung der Expression von MKX nach drei Tagen multipler Stimulation mit BMP7

Mittlerer Querstrich: Median

Oberer und unterer Querstrich: Minimum und Maximum

Obere und untere Begrenzung des Kastens: 25. und 75. Perzentile

* Die Änderung der Expression zwischen diesen Proben ist signifikant ($p < 0,05$)

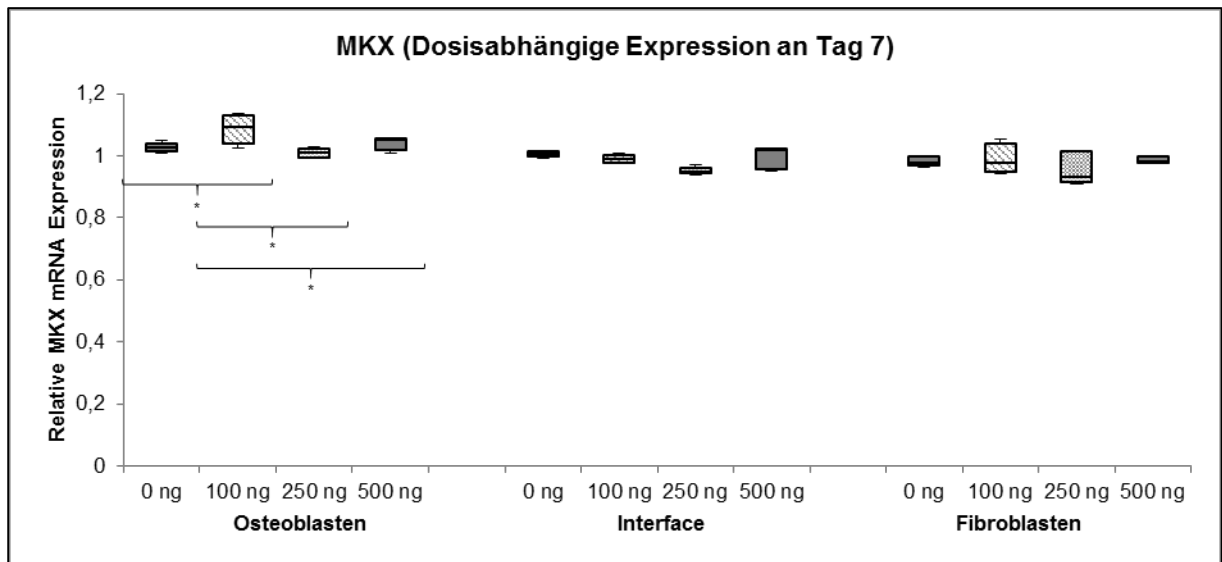


Abbildung 77: Graphische Darstellung der Expression von MKX nach sieben Tagen multipler Stimulation mit BMP7

Mittlerer Querstrich: Median

Oberer und unterer Querstrich: Minimum und Maximum

Obere und untere Begrenzung des Kastens: 25. und 75. Perzentile

* Die Änderung der Expression zwischen diesen Proben ist signifikant ($p < 0,05$)

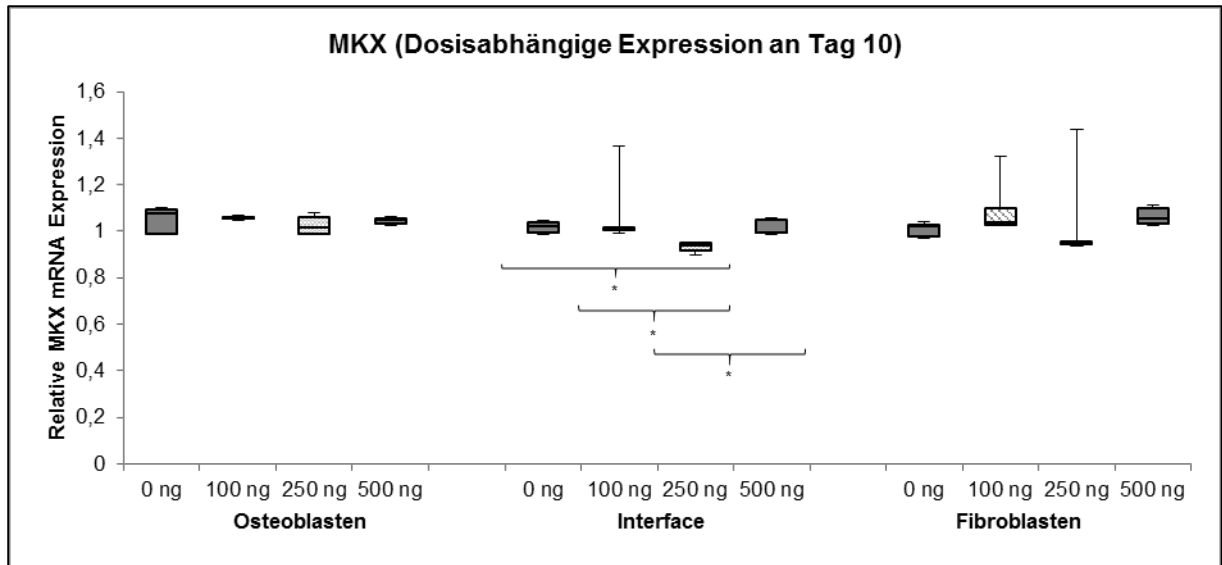


Abbildung 78: Graphische Darstellung der Expression von MKX nach zehn Tagen multipler Stimulation mit BMP7

Mittlerer Querstrich: Median

Oberer und unterer Querstrich: Minimum und Maximum

Obere und untere Begrenzung des Kastens: 25. und 75. Perzentile

* Die Änderung der Expression zwischen diesen Proben ist signifikant ($p < 0,05$)

Tabelle 35: Relative Expression von MKX nach multipler Stimulation mit BMP7

RE MKX nach multipler Stimulation mit BMP7 an Tag 3			
	Präosteoblasten	Intermediärzone	Fibroblasten
0ng/ml			
100ng/ml	1,045	1,017	0,983
250ng/ml	0,969	0,925	0,923
500ng/ml	0,998	0,969	0,933
RE MKX nach multipler Stimulation mit BMP7 an Tag 7			
	Präosteoblasten	Intermediärzone	Fibroblasten
0ng/ml	1,028	1,007	0,979
100ng/ml	1,092	0,990	0,978
250ng/ml	1,012	0,949	0,932
500ng/ml	1,051	1,017	0,983
RE MKX nach multipler Stimulation mit BMP7 an Tag 10			
	Präosteoblasten	Intermediärzone	Fibroblasten
0ng/ml	1,077	1,022	1,021
100ng/ml	1,057	1,011	1,037
250ng/ml	1,017	0,941	0,950
500ng/ml	1,051	0,994	1,056

5. Diskussion

5.1. Einleitung in die Diskussion

Kommt es zum Versagen einer vorderen Kreuzbandersatzplastik, so liegt in 7 Prozent der Fälle ein Therapieversagen aufgrund von biologischem Versagen vor. In 19 Prozent eine Kombination aus biologischem Versagen und mindestens einer weiteren Ursache. (Wright et al. 2010.)

Die Pathophysiologie für das biologische Versagen ist nicht vollständig verstanden. Überschießende Nekrosen des Sehnenersatzes, mangelhafte Vaskularisation, ungenügende zelluläre Proliferation und Repopulation, fehlende Umbauprozesse, die eine histologische Umwandlung der Ersatzsehne hin zu einer bandähnlichen Struktur (Ligamentation) mit Einwachsen in den Knochen bewirken oder eine Kombination dieser Faktoren werden beschrieben. (Ménétrey et al. 2008., Samitier et al. 2015.)

Einheilungsprozesse von Sehnentransplantaten in knöcherne Bohrkanal wie bei einer vorderen Kreuzbandersatzplastik, zeichnen sich durch einen komplizierten Verlauf aus, der in mehreren Stadien abläuft. (Deehan DJ, Cawston TE. 2005., Ménétrey et al. 2008., Samitier et al. 2015.)

Diese neugebildeten Knochen-Sehnen-Verankerungen sind biomechanisch minderwertig im Vergleich zu angeborenen Knochen-Sehnen- bzw. Knochen-Bänderverankerungen (Enthesen). Die Knochen-Sehnenintegration dieser Heilungsprozesse besser zu verstehen und langfristig im klinischen Setting zu optimieren, ist aktuell Gegenstand vieler Arbeiten und Studien. Hierbei zeigt sich, dass speziell eine stabile Verbindung zwischen Transplantat und Bohrkanal in frühen Stadien mit der Bildung von mineralisiertem und nichtmineralisiertem Bindegewebe, für die biomechanische Stabilität entscheidend ist. (Lovric et al. 2012., Ménétrey et al. 2008., Scheffler SU, Unterhase FN, Weiler A. 2008.)

Der Einsatz von BMP2 und BMP7 konnten in mehreren Arbeiten eine gesteigerte Belastbarkeit der Verankerung sowie ein beschleunigtes Einwachsen von Sehnentransplantaten in den Knochen bewirken. (Chan et al.

2016., Chen et al. 2011., Eliasson P, Fahlgren A, Aspenberg P. 2008., Hashimoto et al. 2007., Mihelic et al. 2004., Tellado et al. 2015., Zhang L, Jin AM, Li Q. 2008.)

Einigen Arbeiten beschreiben eine mit der Histologie der natürlichen Enthese vergleichbare Knochen-Sehnenintegrationszonen nach BMP2 Stimulation. (Hashimoto et al. 2007., Rodeo et al. 1999.)

In einer vorangegangenen Forschungsarbeit zeigte sich, dass sich unter anderem Proteine der Extrazellulärmatrix durch Stimulation mit BMP2 und BMP7, in einer Intermediärzone zwischen Fibroblasten und Präosteoblasten einer Ko-Kultur bilden und eine wichtige Rolle für Verwachsungsprozesse in der Knochen-Sehnenintegration spielen. (Schwartz et al. 2015.a, Schwartz et al. 2015.b, Schwartz et al. 2016.)

In der Literatur wurden osteoinduktive bzw. -proliferative Wirkungen sowie chondro- und tenoproliferative Effekte auf Knochen, Knorpel, Sehnen, Bänder und Muskulatur beschrieben. (Carreira et al. 2014.a, Chen D, Zhao M, Mundy GR. 2004., Oryan et al. 2014.)

Neben vielen in vivo Studien an Tieren, wurde bereits auch einige klinische Studien mit BMP2 und BMP7 durchgeführt, allerdings nicht im Bereich der Knochen-Sehnenintegration. (Boon et al. 2011., Fu et al. 2013., Geiger M, Li RH, Friess W. 2003., Gomes-Ferreira et al. 2016., Khan SN, Lane JM. 2004., Poon et al. 2016., White et al. 2007.)

In der Literatur war bisher jedoch keine Arbeit zu finden, die dosis- und zeitabhängige Effekte von BMP2 und BMP7 auf molekularer Ebene, speziell bezüglich der Expression sehnenpezifischer Gene untersucht. Diese Gene kodieren beispielsweise für Proteine bzw. (Poly-)Peptide der Extrazellulärmatrix wie COL1A1, COL1A2, COL5A1, DCN oder FMOD und Transkriptionsfaktoren wie MKX. (Vergleiche Kapitel 2.3.-7.)

In dieser Arbeit wurden murine Präosteoblasten (MC3T3-E1), Fibroblasten (3T6 oder 3T3) sowie eine Intermediärzone hinsichtlich der Expression dieser Gene, mittels eines hoch standardisierten Ko-Kulturmodells untersucht.

5.2. Interpretation der Ergebnisse nach singulärer Stimulation mit BMP2

Die singuläre Stimulation mit BMP2 führte zu einer Abnahme der Expression von COL1A1 in den Osteoblasten. Auf die Expression in der Intermediärzone sowie im Bereich der Fibroblasten wirkte sie stimulierend. Die Expression von COL1A2 nach singulärer BMP2 Stimulation zeigte ein ähnliches Expressionsmuster wie COL1A1. Es kam zur reduzierten Expression im Bereich der Osteoblasten, aber zur Steigerung dieser in der Intermediärzone und in den Fibroblasten. Im Bereich der Intermediärzone war diese allerdings nur bei Stimulationsdosen von 250ng/ml und höher zu sehen. Die ähnlichen Expressionsmuster von COL1A1 und COL1A2 erklären sich aus der Tatsache, dass beide als Untereinheit für Typ I Kollagen fungieren. Die singuläre Stimulation mit BMP2 scheint die Synthese von Typ I Kollagen durch Fibroblasten, wie sie in vivo normalerweise besonders in Sehnen zu finden ist, anzuregen und in Knochenzellen zu hemmen. (Vergleiche Kapitel 2.4.2. und 2.4.3.)

Die Bildung von Kollagen Typ I als Hauptbestandteil von Extrazellulärmatrix durch Fibroblasten scheint somit einen Anteil an der, in einer vorangegangenen Forschungsarbeit beschriebenen Bildung dieser Extrazellulärmatrix in der Intermediärzone zu haben. (Schwartz et al. 2016.)

Die singuläre Stimulation mit BMP2 scheint hinsichtlich der Expression von COL5A1 einen eher hemmenden Effekt auf die Osteoblasten sowie einen leicht expressionssteigernden Effekt auf die Fibroblasten zu haben. Hohe Stimulationsdosen führten nach 3 Tagen zur gesteigerten Expression von COL5A1 im Bereich der Intermediärzone. Dieser Effekt war jedoch an Tag 7 und 10 nicht mehr vorhanden. Ob hier ein expressionslimitierender intrazellulärer oder interzellulärer bzw. parakriner Mechanismus eine Rolle spielt, ist nicht genau zu sagen. Eine vermehrte Expression von COL5A1 im Bereich der Fibroblasten erscheint aber sinnvoll, da es als Hauptanteil von Kollagen Typ V entscheidend für die Stabilisierung von Typ I Kollagenen ist und diese, wie oben beschrieben, hier eine vermehrte Expression zeigen. (Vergleiche Kapitel 2.4.4.)

Hinsichtlich der Expression von DCN ist es nach singulärer Stimulation mit BMP2 schwierig eine signifikante Aussage bezüglich des Effektes zu machen. In der Intermediärzone zeigte sich Großteils eine reduzierte Expression, während bei den Osteoblasten sowie Fibroblasten eine eher expressionssteigernde Wirkung beobachtet werden konnten. DCN wirkt als Proteoglycan stabilisierend auf Kollagene. Eine gesteigerte Expression in Bereichen, in denen die Kollagenexpression gesteigert ist, ist durchaus verständlich. Weshalb es jedoch zur Expressionssteigerung in den Osteoblasten kommt, ist nicht genau zu sagen. Vorstellbar wäre hier eine Zunahme der Expression in seiner Funktion als Regulator, da DCN in diversen interzellulären Signalwegen mit anderen Wachstumsfaktoren und Interleukinen interagiert. (Vergleiche Kapitel 2.5.)

Die Expression von FMOD war durch singuläre Stimulation mit BMP2 in der Intermediärzone zeitabhängig und bei den Fibroblasten zeit- und dosisabhängig gesteigert. Auch im Bereich der Osteoblasten zeigte sich eine zumeist gesteigerte Expression. Da FMOD für die Bildung und den Aufbau von Kollagenfibrillen in der Extrazellulärmatrix wichtig ist und mit Kollagenen vom Typ I interagiert, erscheint es logisch, dass FMOD ebenso wie COL1A1 und COL1A2 vermehrt durch Fibroblasten und in der Intermediärzone exprimiert wird. (Vergleiche Kapitel 2.6.)

Die singuläre Stimulation mit BMP2 scheint sich steigernd auf die Expression vom MKX in Fibroblasten, Osteoblasten und in der Intermediärzone auszuwirken. Insbesondere in der Intermediärzone und bei den Fibroblasten ist ein starker dosis- und zeitabhängiger Effekt auffällig. Es erscheint ebenfalls logisch, dass MKX in Fibroblasten und der Intermediärzone vermehrt exprimiert wird, da COL1A1, COL1A2, DCN und FMOD hier ebenfalls eine Zunahme der Expression zeigen und MKX als Wachstumsfaktor für die Bildung von Typ I Kollagen, DCN und FMOD in Sehnen eine wichtige Rolle spielt. (Vergleiche Kapitel 2.7.)

Warum jedoch eine erhöhte MKX Expression in Osteoblasten nicht auch hier mit erhöhten Expressionen der oben genannten Gene einhergeht, ist nicht zu sagen. Interaktionen mit weiteren para-, autokrinen oder intrazellulären

Wachstumsfaktoren, Zytokinen oder Regulationsmechanismen sind durchaus vorstellbar.

5.3. Interpretation der Ergebnisse nach multipler Stimulation mit BMP2

Die Expression von COL1A1 zeigte nach multipler Stimulation mit BMP2 ein diffuses Bild. Klare zeit- oder dosisabhängige Effekte hinsichtlich der Expression bestanden nicht. Zusammenfassend kann man von einer eher expressionsmindernden Wirkung durch die multiple Stimulation mit BMP2 hinsichtlich der Expression von COL1A1 auf Osteoblasten, Fibroblasten und in der Intermediärzone sprechen. Vereinzelt zeigten sich jedoch signifikante Expressionsanstiege (Osteoblasten bei 100ng/ml an Tag 10 sowie Intermediärzone bei 100ng/ml und 500ng/ml an Tag 7). Eine generalisierte Aussage bezüglich dosis- und zeitabhängiger Wirkung der Stimulation lässt sich jedoch nicht treffen.

Nach multipler Stimulation mit BMP2 bestand hinsichtlich der Expression von COL1A2 ein ähnliches Bild wie bei der von COL1A1. Es zeigten sich bei beiden Genen in den gleichen Proben die oben beschriebenen Ausreißer in Form von signifikanten Expressionsanstiegen. Auch die multiple Stimulation mit BMP2 scheint sich auf die Expression von COL1A1 und COL1A2 gleich auszuwirken, da beide als Untereinheiten von Typ I Kollagen fungieren und somit vermutlich gemeinsam exprimiert oder gehemmt werden. (Vergleiche Kapitel 2.4.2., 2.4.3. und 5.2.)

Auch bezüglich der Expression von COL5A1 kann man zusammenfassend von einer nicht signifikanten Reduktion durch die multiple Stimulation mit BMP2 in Osteoblasten, Fibroblasten und der Intermediärzone sprechen. Es zeigten sich ebenfalls Ausreißer im Bereich der Osteoblasten und der Intermediärzone. Es bestehen auch nach multipler Stimulation mit BMP2 ähnliche Expressionsmustern von COL5A1, COL1A1 und COL1A2. (Vergleiche Kapitel 5.2.)

Wegen der gegenseitigen Stützfunktion von Typ V Kollagenen und Typ I Kollagenen in der Extrazellulärmatrix, ist dies vermutlich auf eine aneinander angepasste Expression zurückzuführen. (Vergleiche Kapitel 2.4.2., 2.4.3 und 2.4.4.)

Anhand der Expression scheinen die untersuchten Kollagene unter multipler Stimulation mit BMP2 weniger Anteil an der Extrazellulärmatrix in der Verwachsungszone zwischen Osteoblasten und Fibroblasten (Intermediärzone) zu haben. (Schwartz et al. 2015., Schwartz et al. 2016.)

Die Expression von DCN in Osteoblasten, Fibroblasten und in der Intermediärzone war nach multipler Stimulation mit BMP 2 zumeist reduziert. Auch hier gab es signifikante Ausreißer. Des Weiteren zeigte sich ein dem der Typ I Kollagene ähnliches Expressionsverhalten. Dies ist dadurch zu erklären, dass DCN einerseits für die Stabilisierung und Ordnung, andererseits als Regulationsfaktor für die Synthese dieser eine wichtige Rolle spielt. (Vergleiche Kapitel 2.5.)

Bezüglich der Expression von FMOD war ein nicht signifikanter Anstieg im Bereich der Osteoblasten, aber hemmende Effekte im Bereich der Fibroblasten und der Intermediärzone auszumachen. Im Bereich der Intermediärzone gab es signifikante Ausreißer mit Expressionsanstieg, die sich bei den anderen Genen ebenfalls gezeigt hatten. Auch hier scheinen ähnliche Expressionsmuster für eine Interaktion und Beeinträchtigung der wechselseitigen Funktion der Genprodukte zu sprechen. (Vergleiche Kapitel 2.6.)

Die multiple Stimulation mit BMP2 wirkte hemmend auf die Expression von MKX durch Osteoblasten, Fibroblasten und in der Intermediärzone aus. Auch hier zeigten sich im Bereich der Osteoblasten und der Intermediärzone signifikante Ausreißer, die zum Teil denen von COL1A1, COL1A2, COL5A1 und DCN glichen. Dass MKX als Transkriptionsfaktor Einfluss auf die Expression von Typ I Kollagenen und DCN hat, ist bereits beschrieben. Ähnliche Expressionsmuster sind also durchaus verständlich. Dass MKX unter multipler Stimulation mit BMP2 aber auch eine Wirkung auf bzw. eine Wechselwirkung mit COL5A1 hat, ist neu. Diese wechselseitigen Beziehungen müssten aber

weiter und spezieller untersucht werden, um hierzu eine genaue Aussage treffen zu können. (Vergleiche Kapitel 2.7.)

5.4. Interpretation der Ergebnisse nach singulärer Stimulation mit BMP7

Die singuläre Stimulation mit BMP7 hatte hemmende Effekte auf die Expression von COL1A1 durch Osteoblasten, Fibroblasten und in der Intermediärzone mit Ausnahme der mit 100ng/ml stimulierten Proben. Diese zeigten gesteigerte Expressionswerte in allen Bereichen, die im zeitlichen Verlauf jedoch rückläufig waren. Bezüglich der Expression von COL1A2 zeigte sich ebenfalls eine hemmende Wirkung in den meisten Proben. Im Bereich der Fibroblasten zeigt sich jedoch eine kurzzeitige expressionssteigernde Wirkung bei der Stimulation mit 100ng/ml. Das Expressionsverhalten von COL1A1 und COL1A2 nach multipler Stimulation mit BMP7 ähnelte sich speziell im Bereich der Fibroblasten. Wie bei den mit BMP2 stimulierten Proben, weist dies auch hier auf eine koordinierte Expression der beiden Typ I Kollagen Untereinheiten hin. (Vergleiche Kapitel 2.4.2., 2.4.3., 5.2. und 5.3.)

Interessant ist, dass speziell die mit 100ng/ml stimulierten Proben eine expressionssteigernde Wirkung zeigten, die im zeitlichen Verlauf rückläufig waren. Hier könnten Regulationsmechanismen eine Rolle spielen, die bei höheren Wirkstoffkonzentrationen einen hemmenden Effekt auf die Expression entfalten. Andererseits könnten Störfaktoren aufgrund der langen Inkubationszeit Einfluss nehmen, die die Stimulation durch die Wachstumsfaktoren und das Nährmedium negativ beeinflussen und somit expressionsmindernd wirken.

Die singuläre Stimulation mit BMP7 hatte einen eher hemmenden Effekt auf die Expression von COL5A1 durch Osteoblasten, Fibroblasten und in der Intermediärzone. Diese hemmende Tendenz, ähnlich der bei der Expression von COL1A1 und COL1A2 lässt darauf schließen, dass die singuläre Stimulation mit BMP7 zu einer reduzierten Synthese von Typ I und Typ V Kollagen sowohl in Osteoblasten als auch in Fibroblasten führt.

Die singuläre Stimulation mit BMP7 hatte hinsichtlich der DCN Expression eine hemmende Wirkung auf Osteoblasten sowie Fibroblasten und auf die meisten Proben der Intermediärzone. Es zeigt sich in dieser jedoch eine kurzzeitige Steigerung der maximal stimulierten Proben. Dieser Effekt war zeitlich nur von kurzer Dauer. Aufgrund dessen kann man vermuten, dass DCN als Proteoglycan hier einen größeren Anteil an den Genprodukten der Extrazellulärmatrix in der Intermediärzone hat. (Schwarming et al. 2015., Schwarming et al. 2016.) (Vergleiche Kapitel 2.5.)

Bezüglich der Expression von FMOD kann man bei der singulären Stimulation mit BMP7 von einer hemmenden Wirkung in den meisten Proben sprechen, wobei die mit 100ng/ml stimulierten Proben eine kurzzeitige Steigerung dieser in den Osteoblasten und Fibroblasten zeigten. Auch bei der singulären Stimulation mit BMP7 zeigten sich ähnliche Expressionsmuster von COL1A1, COL1A2 und FMOD. Dies weist wie bereits bei der singulären Stimulation mit BMP2 beobachtet, auf die spätere Interaktion vom FMOD mit Typ I Kollagenen und die Regulation deren Synthese hin. (Vergleiche Kapitel 2.7. Und 5.2.)

Die singuläre Stimulation mit BMP7 hat in den meisten Proben eine steigernde Wirkung auf die Expression von MKX in allen Bereichen. Diese Steigerung war speziell im Bereich der Osteoblasten signifikant. Auch hier zeigt sich, wie bei COL1A1, COL1A2 und FMOD, dass die Expressionssteigerung im zeitlichen Verlauf abnimmt bzw. zeitlich begrenzt ist. Ob diese Wirkung auf eine abnehmende BMP7 Konzentration im Nähmedium, Störfaktoren oder auto-, parakrine oder intrazelluläre Regulationsmechanismen zurück zu führen ist, kann anhand dieser Arbeit nicht geklärt werden. Interessant ist, dass bei der singulären Stimulation mit BMP7 die Expressionssteigerung des Transkriptionsfaktors MKX nicht mit einer Steigerung der Expression von COL1A1, COL1A2 und DCN im gleichen Ausmaß einhergeht. Dies war bei den mit BMP2 stimulierten Proben anders zu beobachten. (Vergleiche Kapitel 2.7., 5.2. und 5.3)

5.5. Interpretation der Ergebnisse nach multipler Stimulation mit BMP7

Die multiple Stimulation mit BMP7 hat hinsichtlich der Expression von COL1A1 einen eher hemmenden Einfluss auf die meisten Proben. Signifikante Expressionsanstiege waren bei den mit 100ng/ml stimulierten Proben an Tag sieben im Bereich der Osteoblasten und den mit 500ng/ml stimulierten an Tag zehn im Bereich der Fibroblasten zu beobachten. Welche Faktoren zu diesen Expressionsanstiegen geführt haben, ist durch diese Arbeit nicht zu beantworten. Bei den mit 100ng/ml stimulierten Proben aus dem Bereich der Osteoblasten kam es nach Tag sieben wieder zu einer Abnahme der Expression von COL1A1, was auf eine Interaktion mit weiteren Regulatoren oder Störfaktoren schließen lässt. Auf die Expression von COL1A2 hat die multiple Stimulation mit BMP7 in Osteoblasten, in Fibroblasten und in der Intermediärzone eine steigernde Wirkung. Interessant ist, dass sich bei der multiplen Stimulation mit BMP7 im Gegensatz zu der singulären Stimulation mit BMP7 und zu der mit BMP2 die Expressionsmuster von COL1A1 und COL1A2 nicht ähnelten. Auch der komplett gegensätzliche Effekt der singulären und multiplen BMP7 Stimulation auf die COL1A2 Expression ist unerwartet. Hier könnte entweder der Einfluss von Störfaktoren aufgrund der langen Inkubationszeit oder auto-, parakrine bzw. intrazelluläre Regulationsmechanismen zu einer gesteigerten Synthese des einen Bestandteils von Typ I Kollagen zu führen, während der andere gehemmt wird. Eine Erklärung hierfür ist anhand dieser Arbeit nicht möglich. (Vergleiche Kapitel 2.4.2., 2.4.3., 5.2., 5.3. und 5.4.)

Bezüglich der Expression von COL5A1 scheint die multiple Stimulation mit BMP7 eine expressionssteigernde Wirkung in Osteoblasten und in der Intermediärzone zu haben. Im Bereich der Fibroblasten zeigten die meisten Proben unveränderte bzw. reduzierte Expressionswerte mit signifikantem, zeitabhängigem Anstieg bei den mit 100ng/ml und 500ng/ml stimulierten Proben. Auffällig ist, dass im Gegensatz zur singulären Stimulation mit BMP7, die multiple Stimulation eher expressionssteigernd hinsichtlich COL5A1 und COL1A2 wirkt, insbesondere auf Osteoblasten. (Vergleiche Kapitel 5.4.)

Die Expression von DCN war im Bereich der Osteoblasten gesteigert, im Bereich der Fibroblasten und in der Intermediärzone in den meisten Proben gehemmt. Auch auf DCN hat die multiple Stimulation mit BMP7 im Gegensatz zur singulären einen expressionssteigernden Effekt auf die Osteoblasten. (Vergleiche Kapitel 5.4.)

Bezüglich der Expression von FMOD kann man von einer expressionssteigernden Wirkung bei bestimmten Wirkstoffkonzentrationen auf Osteoblasten sprechen. In der Intermediärzone und auf Fibroblasten war eher ein hemmender Einfluss auf die Expression auszumachen, wobei eine hohe Wirkstoffkonzentration und lange Stimulation auf Fibroblasten einen expressionssteigernden Effekt zeigte. Dieses Expressionsmuster ähnelt dem von COL1A1 nach multipler Stimulation mit BMP7 und ist auch hier ein Indiz für die wechselseitige Beeinflussung der Synthese und spätere Interaktion von COL1A1 und FMOD in der Extrazellulärmatrix. (Vergleiche Kapitel 2.6.)

Die multiple Stimulation mit BMP7 hatte eine expressionssteigernde Wirkung, mit signifikanter Steigerung der Expression von MKX bei einigen Proben im Bereich der Osteoblasten und einem eher hemmenden Einfluss auf die Expression in Fibroblasten und in der Intermediärzone. Hier zeigten sich, wie bei den mit BMP2 stimulierten Proben, vergleichbare Expressionsmuster von MKX und DCN, was die bereits beschriebene Wirkung von MKX auf die Synthese von DCN unterstreicht. (Vergleiche Kapitel 5.2., 5.3. und 2.7.)

Auffällig ist, dass durch die multiple Stimulation mit BMP7 eine Steigerung der Genexpression der meisten untersuchten Gene im Bereich der Osteoblasten erreicht werden konnte. Dieser Effekt war bereits in vorangegangenen Arbeiten beschrieben worden (Schwartz et al. 2015.)

5.6. Ausblick und Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern einen Einblick in zellspezifische, molekularbiologische Veränderungen von und Interaktionen in

Expressionsprozessen sehnenspezifischer Gene, nach einfacher und mehrfacher Stimulation mit BMP2 oder BMP7.

Es zeigten sich unter anderem zellspezifische Unterschiede zwischen singulär oder multipel stimulierten Proben mit demselben Wachstumsfaktor hinsichtlich des Expressionsverhaltens. So wirkte beispielsweise die singuläre BMP2 Stimulation auf Osteoblasten eher hemmend und auf Fibroblasten steigernd bezüglich der Expression der untersuchten Kollagene, während die multiple Stimulation diesbezüglich hemmend auf beide Zellreihen wirkte. (Vergleiche Kapitel 5.2. und 5.3.)

Klatte-Schulz et al. beschrieben 2013 einen ähnlich expressionssteigernden Effekt hinsichtlich Kollagen Typ 1, nach singulärer Stimulation mit BMP2 in humanen Tenozyten. Hier konnte durch eine Dosissteigerung eine Zunahme der Expression erreicht werden. Es wurden allerdings nur zu einem Zeitpunkt Proben aus dem verwendeten Zellkulturmodell zur Untersuchung der Genexpression entnommen. Aussagen hinsichtlich zeitabhängiger Expressionsänderungen waren somit nicht möglich. Eine multiple Stimulation der Zelllinien fand ebenfalls nicht statt. (Klatte-Schulz et al. 2013.)

Bei den mit BMP7 stimulierten Proben zeigte sich beispielsweise ein eher hemmender Effekt bei singulärer Stimulation auf die Expression von COL1A2, COL5A1, DCN und FMOD in den Osteoblasten, während die multiple Stimulation hier Expressionssteigern wirkte. (Vergleiche Kapitel 5.4. und 5.5.) Dies zeigt, dass hier die multiple Stimulation mit einem Wachstumsfaktor im Vergleich zur singulären nicht zur Verstärkung des molekularbiologischen Effektes führt, sondern zu einem entgegengesetztem Expressionsverhalten. Es konnte in dieser Arbeit für keines der untersuchten Gene eine Verstärkung des Effektes der singulären Stimulation durch multiple Stimulation sowohl in Fibroblasten, Präosteoblasten als auch der Intermediärzone nachgewiesen werden. (Vergleiche Kapitel 5.2., 5.3., 5.4. und 5.5.)

Auch die Wachstumsfaktoren an sich hatten unterschiedliche, zellspezifische Effekte. Als Beispiel hierfür ist die Expression der untersuchten Kollagene durch Fibroblasten nach singulärer Stimulation mit BMP2, im Vergleich zu BMP7 zu nennen. Während die singuläre Stimulation mit BMP2 hier eher

expressionssteigernd wirkt, ist bei BMP7 eine Abnahme der Expression zu verzeichnen. (Vergleiche Kapitel 5.2 und 5.4.)

Kaps et al. beschreiben in ihrer Arbeit von 2002 einen hemmenden Effekt durch BMP7 auf die Expression von COL1A2 in bovinen Chondrozyten, der durch BMP2 nicht gegeben ist. Die Expression von COL1A1 und COL5A1 wurde hier nicht untersucht. (Kaps et al. 2002.)

Pauly et al. konnten wiederum eine Expressionssteigerung sowie vermehrte Synthese von Typ I Kollagen in humanen Tenozyten nach Stimulation mit BMP7 nachweisen, während eine Stimulation mit BMP 2 zwar zu einer signifikanten Synthesesteigerung, aber nur geringen Expressionssteigerung führte. (Pauly et al. 2012.)

Die Vergleichbarkeit der Arbeiten hinsichtlich des Expressionsverhaltens ist jedoch durch die jeweilige Stimulationsmethode und insbesondere die untersuchten Zellen limitiert. In dieser Arbeit wurden murine Fibroblasten aus in vitro Zelllinien untersucht, während Kaps et al. und Pauly et al. spezifisch differenzierte Fibrozyten und Chondrozyten verwendeten, welche zuvor aus bovinem bzw. humanem Gewebe gewonnen wurden.

In dieser Arbeit war zu beobachten, dass insbesondere die singuläre Stimulation mit BMP2 in den Fibroblasten und die multiple Stimulation mit BMP7 in den Osteoblasten zu einer Expressionssteigerung der meisten, untersuchten Gene führt. (Vergleiche Kapitel 5.2 und 5.5.)

Dieser Effekt war zum Teil in einer vorangegangenen Arbeit bereits beschrieben worden (Schwartz et al. 2015.)

Es waren mehrfach gleiche Expressionsmuster von Genen bei gleicher Stimulation auszumachen. Speziell MKX zeigte oft ein ähnliches Expressionsmuster wie das der anderen untersuchten Gene, was dafürspricht, dass der Wachstumsfaktor MKX auf die Expression dieser Gene Einfluss nimmt. (Vergleiche Kapitel 2.7., 5.2., 5.3. und 5.5.)

Interessant ist das Expressionsverhalten in der Intermediärzone. Es zeigte sich hier eine von Gen zu Gen und von Stimulation zu Stimulation, zu der der Fibroblasten, der der Osteoblasten oder zu der beider Zellreihen unterschiedliche Expression. In den Vorgängerprojekten wurde beschrieben,

dass sowohl Fibroblasten als auch Osteoblasten in diesen Bereich einwachsen. Generell handelt es sich bei der Intermediärzone um ein zellarmes Gewebe mit überwiegendem Anteil an Extrazellulärmatrix. (Schwartz et al. 2015., Schwartz et al. 2016.)

Wang et al. beschrieben in ihrem Ko-Kulturmodell ebenfalls die Bildung einer zellarmen Intermediärzone. In den untersuchten Ko-Kulturen fand jedoch keine Stimulation mit BMP2 oder BMP7 statt. Untersucht wurden hier Genprodukte die auch in den faserknorpeligen Zonen der Enthese, zwischen vorderem Kreuzband und Knochen in vivo zu finden sind. Es wurde eine Zelltransformation postuliert, welche zur Bildung der faserknorpeligen Intermediärzone führt. (Wang et al. 2007.) (Vergleiche Kapitel 2.2.)

Es lohnt sich also das Expressionsverhalten der Intermediärzone näher zu betrachten. Hier zeigt sich, dass die multiple Stimulation mit BMP7 zu einem Anstieg der COL5A1 Expression führt, während durch singuläre Stimulation mit BMP2 eine Expressionssteigerung von COL1A1 und COL1A2 zu beobachten ist. Dies ist interessant, da Typ V Kollagene Hauptbestandteil der mineralisierten, faserknorpeligen Zone der natürlichen Enthese und Typ I Kollagen der nicht mineralisierten, faserknorpeligen Zone ist. (Vergleiche Kapitel 2.2.)

In einem der Vorgängerprojekten wurde beschrieben, dass durch die Stimulation mit BMP7 die Expression der alkalischen Phosphatase sowie von Osteocalcin in der Intermediärzone gesteigert werden konnte. Beide spielen für Mineralisationsprozesse eine wichtige Rolle. (Schwartz et al. 2015.)

Es könnte also angenommen werden, dass durch BMP7 Stimulation im Ko-Kulturmodell die Formation einer Extrazellulärmatrix ähnlich der der mineralisierten, faserknorpeligen Zone der Enthese angeregt wird. Allerdings war in einem weiteren Vorgängerprojekt ein ähnlicher Effekt auf die Expression der alkalischen Phosphatase und des Osteocalcin durch BMP2 Stimulation beschrieben worden. (Schwartz et al. 2015.)

In der aktuellen Literatur finden sich keine Arbeiten, die einen Vergleich dieser Ergebnisse erlauben.

Es ist anzunehmen, dass für das oben beschriebene, gen- und stimulationsspezifische Expressionsverhalten der Intermediärzone, interzellulärer Interaktionen sowie auto-, parakrine oder intrazelluläre Regulationsmechanismen eine wichtige Rolle spielen. (Vergleiche 5.2., 5.3., 5.4., und 5.5.)

Diese Interaktionsprozesse zwischen den Zellen sowie die Identifikation beteiligter Zytokine und Wachstumsfaktoren genauer zu untersuchen, wäre ein Ansatz für weitere Arbeiten im Bereich der Knochen-Sehnenintegrationsforschung.

Ein weiterer Forschungsansatz wäre die Expression von Genen bzw. Synthese von Genprodukten, die an Ligamentationsprozessen beteiligt sind zu untersuchen. Neben der Expression solcher Gene im Bereich der Fibroblasten und der Intermediärzone in dem hier verwendeten Ko-Kulturmodell, wären auch Untersuchungen hinsichtlich der Wirkung auf differenzierte Tenozyten, mit und ohne Stimulation durch BMP2 oder BMP7 interessant. Solche Gene bzw. Genprodukte sind z.B. Bestandteile von Typ III Kollagen. (Amiel et al. 1984., Amiel et al. 1986., Murmo et al. 2005)

Für den klinischen Einsatz von BMP2 und BMP7 im Bereich der Knochen-Sehnenintegration sind vor allem in vivo Studien hinsichtlich der Indikation, Nebenwirkungen, Langzeitergebnisse und Sicherheit nötig.

5.7. Limitationen dieser Arbeit

Die größte Einschränkung des in dieser Arbeit verwendeten Studiendesign ist, dass es sich hierbei um ein in vitro Modell handelt. Es werden die Bedingungen der Knochen-Sehnenintegration vereinfacht durch ein Ko-Kulturmodell dargestellt, das viele Einflussfaktoren, die in vivo eine Rolle spielen, außer Acht lässt. So kann der Effekt weiterer Wachstumsfaktoren, Mediatoren und auch biomechanischer Einflüsse, die beim Einwachsen eines Sehnen transplantates in einen Bohrkanal eine Rolle spielen, nicht beurteilt werden.

Bezüglich des Zieles, BMP2 und BMP7 zur Verbesserung der Transplantateinheilung bei Kreuzbandersatzplastiken klinisch anwenden zu können, sind die Ergebnisse dieser Arbeit nur bedingt aussagekräftig, da für das verwendete Ko-Kulturmodell murine und nicht humane Zellreihen verwendet wurden. Die Verwendung muriner Zellreihen hat den Hintergrund, dass diese bereits in vorherigen Studien eingesetzt wurden und global erhältlich sind. Somit besteht eine höhere Reproduzierbarkeit der Ergebnisse für künftige Arbeiten.

Des Weiteren ist aufgrund der zeitlichen Beschränkung der Versuchsreihen auf zehn Tage nur eine begrenzte Aussage hinsichtlich möglicher Langzeiteffekte machbar.

Da es sich bei dem verwendeten Ko-Kulturmodell um einen sehr anfälligen Versuchsaufbau handelt, können biologische Effekte durch Verunreinigungen von außen, auch wenn unter maximalst möglichen hygienischen Bedingungen gearbeitet wurde und regelmäßige Überprüfungen auf irreguläre Wachstumsmuster stattfanden, nicht vollständig ausgeschlossen werden. Auch das mehrfache ein- und wieder auftauen der entnommenen Proben zur Genanalyse durch die Real-Time PCR, kann Einfluss auf die Qualität dieser genommen haben.

Darüber hinaus kann eine minimale Migration der Präosteoblasten durch die Intermediärzone hindurch in den Bereich der Fibroblasten und umgekehrt nicht ausgeschlossen werden. Dies schränkt die Aussagekraft dieser Arbeit hinsichtlich der Genexpression einer Zellreihe, speziell in den Proben die nach längeren Zeiträumen entnommen wurden ein.

In dieser Arbeit wurde die Expression der Gene auf Grundlage der cDNA Konzentration, welche aus mRNA überschrieben wurde, ermittelt. Es wurden keine Proteinkonzentrationen der Genprodukte selbst bestimmt. Alle Aussagen hierzu entspringen der Annahme, dass die mRNA eins zu eins zur Proteinsynthese und somit zur Produktbildung führt. Mögliche Einflussfaktoren hierauf wurden außer Acht gelassen, da sie die Aussagekraft des Studiendesigns übersteigen.

6. Zusammenfassung

Rupturen des vorderen Kreuzbandes gehören zu den häufigsten Verletzungen des Kniegelenks, besonders bei jungen, sportlich aktiven Menschen. Es ist eine Zunahme der operativ versorgten Rupturen über die Jahre zu verzeichnen.

Bei ca. 11,6 Prozent der operativ, mittels Kreuzbandersatzplastik versorgten Rupturen, kommt es zum Therapieversagen. Die häufigsten Ursachen des Therapieversagens sind fehlerhafte Operationstechnik, biologisches Versagen bzw. insuffizientes Einwachsen und erneute Traumata. Die Pathophysiologie des biologischen Versagens ist nicht komplett verstanden, da der Einheilungsprozess des Sehnentransplantates in einen knöchernen Bohrkanal äußerst komplex ist. Neugebildete Knochen-Sehnenverankerungen sind jedoch im Vergleich zu angeborenen Enthesen biomechanisch minderwertig. Die Knochen-Sehnenintegration dieser Heilungsprozesse zu verbessern ist aktuell Gegenstand vieler Arbeiten und Studien. Hierbei zeigte der Einsatz von BMP2 und BMP7 in mehreren Arbeiten eine gesteigerte Belastbarkeit der Verankerung sowie ein beschleunigtes Einwachsen von Sehnentransplantaten in den Knochen. Die BMPs gehören zu den Wachstumsfaktoren der TGF- β -Familie. In der Literatur war bisher keine Arbeit zu finden, die dosis- und zeitabhängige Effekte von BMP2 und BMP7 auf molekularer Ebene, speziell bezüglich der Expression sehnenspezifischer Gene, untersuchte. In dieser Arbeit wurden murine Präosteoblasten (MC3T3-E1), Fibroblasten (3T6 oder 3T3) sowie eine Intermediärzone hinsichtlich der Expression der oben genannten Gene nach einfacher und mehrfacher Stimulation mit BMP2 und BMP7, mittels eines hoch standardisierten Ko-Kulturmodells und Real-Time PCR untersucht. Analysiert wurde die Expression von COL1A1, COL1A2, COL5A1, DCN, FMOD und MKX. Es wurde ein Einblick in zellspezifische und molekularbiologische Veränderungen von bzw. Interaktionen in Expressionsprozessen sehnenspezifischer Gene gewonnen. Unter anderem zeigten sich zellspezifische Unterschiede in der Genexpression zwischen den, mit dem gleichen BMP, singulär und multipel stimulierten Proben. Durch multiple Stimulation mit einem der Wachstumsfaktoren kam es bei keinem der

untersuchten Gene zur Verstärkung der beobachteten Effekte der singulären Stimulation. Auch die Wachstumsfaktoren an sich hatten unterschiedliche Effekte. Nach singulärer Stimulation mit BMP2 zeigte sich eine Expressionssteigerung der untersuchten Kollagenuntereinheiten sowie von DCN, FMOD und MKX im Bereich der Fibroblasten. Die multiple Stimulation mit BMP7 zeigte einen Expressionssteigernden Effekt auf die Präosteoblasten hinsichtlich der untersuchten Gene, mit Ausnahme von COL1A1. Mehrfach zeigten sich ähnliche Expressionsmuster von Genen bei gleicher Stimulation. In der Intermediärzone zeigte sich eine zu der der Fibroblasten, der der Präosteoblasten oder zu der beider Zellreihen unterschiedliche Expression. Die multiple Stimulation mit BMP 7 führte hier zu einem Anstieg der Expression von COL5A1 wohingegen es nach singulärer Stimulation mit BMP2 zu einem Expressionsanstieg der Typ I Kollagenuntereinheiten kam. Aus vorangegangenen Arbeiten wissen wir, dass beide Zellreihen in die Intermediärzone einwachsen. Es lässt sich darauf schließen, dass es wechselseitige auto-, parakrine oder intrazelluläre Regulationsmechanismen bzw. Interaktionen zwischen den Zellen gibt, die zu diesem gen- und stimulationsspezifischem Expressionsverhalten führen. Dieses näher und ggf. hinsichtlich weiterer Gene, die im Knochen-Sehnenintegrationsprozess eine Rolle spielen zu untersuchen, wäre ein Ansatz für weitere Forschungsarbeiten. Für den klinischen Einsatz von BMP2 und BMP7 im Bereich der Knochen-Sehnenintegration sind weitere Studien, speziell hinsichtlich der Indikation, Nebenwirkungen, Langzeitergebnisse und Sicherheit nötig.

7. Abstract

Ruptures of the anterior cruciate ligament are very common knee injuries, especially among young and athletic persons. Arthroscopic reconstructions of the anterior cruciate ligament have been performed more frequently over the last decades. In about 11.6 percent of the cases the surgical therapy fails. This is caused by either surgical failure, another traumatic experience or biological failure. The pathophysiology of the biological failure is very complex. The process of developing a stable link between the tendon graft and the bone during the healing period is also complex and passes several stages. This newly formed artificial tendon-bone link is biomechanically inferior to native tendon-bone or ligament-bone links. Increasing the stability of these links is the focus of several research groups. BMP2 and BMP7 are growth factors which have shown a positive effect on tendon-bone healing in several non-clinical trials. There have already been clinical trials using BMP2 and BMP7 to improve bone healing. Until now time and dose dependent molecular biological effects of these growth factors regarding the expression of tendon specific genes have not been described. Within this trial we examined the expression of those genes. Therefore, we used a highly standardized co-culture model as well as real-time PCR. The expression of COL1A2, COL1A2, COL5A1, DCN, FMOD and MKX by murine preosteoblasts (MC3T3-E1), fibroblasts (3T6 or 3T3) and in an interface region, after singular and multiple stimulation with BMP2 and BMP7 has been analyzed. We got an insight in cellular and molecular biological changes and interactions of gene expression. There have been cellular differences between singular and multiple stimulation using the same growth factor. That means multiple stimulation does not necessarily increase the biological effect of those growth factors. In addition to that, the different growth factors caused different results in gene expression. The singular stimulation with BMP2 increased the expression of the examined genes in fibroblast. After multiple stimulation with BMP7 we found an increased expression of the examined genes except COL1A1 in preosteoblasts. Furthermore, equal stimulation often led to similar patterns of expression in several genes. Another

interesting result was found regarding the interface region. This area usually showed different patterns of gene expression compared to those of the fibroblasts or osteoblasts region. After multiple stimulation with BMP7 we found an increased expression of COL5A1 in this area whereas singular stimulation with BMP2 increased the expression of COL1A1 and COL1A2. From former projects we know that preosteoblasts as well as fibroblasts migrate into the interface region. This may lead to the conclusion that both types of cells influence each other by auto-, paracrine or cellular mediators. In order to understand these effects and method of regulation further trials are needed. With regard to the clinical use of BMP2 and BMP7 in tendon-bone healing it is necessary to expedite further research regarding indication, side effects, long term results and safety.

8. Literaturverzeichnis

1. Abrahams, Y.; Laguette, M.-J.; Prince, S.; Collins, M. (2013): Polymorphisms within the COL5A1 3'-UTR that alters mRNA structure and the MIR608 gene are associated with Achilles tendinopathy. In: *Annals of human genetics* 77 (3), S. 204–214. DOI: 10.1111/ahg.12013.
2. Abrams, G. D.; Renstrom, P. A.; Safran, M. R. (2012): Epidemiology of musculoskeletal injury in the tennis player. In: *British journal of sports medicine* 46 (7), S. 492–498. DOI: 10.1136/bjsports-2012-091164.
3. Ageberg, E.; Pettersson, A.; Fridén, T. (2007): 15-year follow-up of neuromuscular function in patients with unilateral nonreconstructed anterior cruciate ligament injury initially treated with rehabilitation and activity modification: a longitudinal prospective study. In: *The American journal of sports medicine* 35 (12), S. 2109–2117. DOI: 10.1177/0363546507305018.
4. Agel, J.; Arendt, E. A.; Bershadsky, B. (2005): Anterior cruciate ligament injury in national collegiate athletic association basketball and soccer: a 13-year review. In: *The American journal of sports medicine* 33 (4), S. 524–530. DOI: 10.1177/0363546504269937.
5. Altinisik, J.; Meric, G.; Erduran, M.; Ates, O.; Ulusai, A. E.; Akseki, D. (2015): The BstUI and DpnII Variants of the COL5A1 Gene Are Associated With Tennis Elbow. In: *The American journal of sports medicine* 43 (7), S. 1784–1789. DOI: 10.1177/0363546515578661.
6. Amiel, D.; Frank, C.; Harwood, F.; Fronek, J.; Akeson, W. (1984): Tendons and ligaments: A morphological and biochemical comparison. In: *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society* 1 (3), S. 257–265.
7. Amiel, D.; Kleiner, J. B.; Roux, R. D.; Harwood, F. L.; Akeson, W. H. (1986): The phenomenon of "ligamentization": anterior cruciate ligament reconstruction with autogenous patellar tendon. In: *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society* 4 (2), S. 162–172. DOI: 10.1002/jor.1100040204.

8. Anderson, D. M.; Arredondo, J.; Hahn, K.; Valente, G.; Martin, J. F.; Wilson-Rawls, J.; Rawls, A. (2006): Mohawk is a novel homeobox gene expressed in the developing mouse embryo. In: *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists* 235 (3), S. 792–801. DOI: 10.1002/dvdy.20671.
9. Anderson, D. M.; George, R.; Noyes, M. B.; Rowton, M.; Liu, W.; Jiang, R. et al. (2012): Characterization of the DNA-binding properties of the Mohawk homeobox transcription factor. In: *The journal of biological chemistry* 287 (42), S. 35351–35359. DOI: 10.1074/jbc.M112.399386.
10. Antonsson, P.; Heinegård, D.; Oldberg, Å. (1993): Structure and deduced amino acid sequence of the human fibromodulin gene. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1174 (2), S. 204–206. DOI: 10.1016/0167-4781(93)90117-V.
11. Arastu, M. H.; Grange, S.; Twyman, R. (2015): Prevalence and consequences of delayed diagnosis of anterior cruciate ligament ruptures. In: *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy: official journal of the ESSKA* 23 (4), S. 1201–1205. DOI: 10.1007/s00167-014-2947-z.
12. Benjamin, M.; Kumai, T.; Milz, S.; Boszczyk, B. M.; Boszczyk, A.A.; Ralphs, J.R. (2002): The skeletal attachment of tendons--tendon "entheses". In: *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 133 (4) S. 931-945. DOI:10.1016/s1095-6433(02)00138-1.
13. Bere, T.; Mok, K.-M.; Koga, H.; Krosshaug, T.; Nordsletten, L.; Bahr, R. (2013): Kinematics of anterior cruciate ligament ruptures in World Cup alpine skiing: 2 case reports of the slip-catch mechanism. In: *The American journal of sports medicine* 41 (5), S. 1067–1073. DOI: 10.1177/0363546513479341.
14. Bollen, S. (2000): Epidemiology of knee injuries: diagnosis and triage. In: *British journal of sports medicine* 34 (3), 227-a-228. DOI: 10.1136/bjsm.34.3.227-a.
15. Boon, M. R.; van der Horst, G.; van der Pluijm, G.; Tamsma, J. T.; Smit, J. W. A.; Rensen, P. C. N. (2011): Bone morphogenetic protein 7: a broad-spectrum growth factor with multiple target therapeutic potency. In: *Cytokine & growth factor reviews* 22 (4), S. 221–229. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2011.08.001.

16. Bragdon, B.; Moseychuk, O.; Saldanha, S.; King, D.; Julian, J.; Nohe, A. (2011): Bone morphogenetic proteins: a critical review. In: *Cell Signal* 23(4), S. 609–20.

17. Brophy, R. H.; Wright, R. W.; Matava, M. J. (2009): Cost analysis of converting from single-bundle to double-bundle anterior cruciate ligament reconstruction. In: *The American journal of sports medicine* 37 (4), S. 683–687. DOI: 10.1177/0363546508328121.

18. Buijs, J. T.; Henriquez, N. V.; van Overveld, P. G. M.; van der Horst, G.; Dijke, P. t.; van der Pluijm, G. (2007): TGF-beta and BMP7 interactions in tumour progression and bone metastasis. In: *Clinical & experimental metastasis* 24 (8), S. 609–617. DOI: 10.1007/s10585-007-9118-2.

19. Burger, M.; Wet, H. d.; Collins, M. (2015): The COL5A1 gene is associated with increased risk of carpal tunnel syndrome. In: *Clinical rheumatology* 34 (4), S. 767–774. DOI: 10.1007/s10067-014-2727-7.

20. Byers, P. H.; Siegel, R. C.; Peterson, K. E.; Rowe, D. W.; Holbrook, K. A.; Smiths, L. T.; Chang, Y.-H.; Fu, J. C. C. (1981): Marfan syndrome: Abnormal $\alpha 2$ chain in type I collagen. In: *Medical Sciences* 78 (12), S. 7745–7749.

21. Cabral, W. A.; Makareeva, E.; Colige, A.; Letocha, A. D.; Ty, J. M.; Yeowell, H. N. et al. (2005): Mutations near amino end of $\alpha 1(I)$ collagen cause combined osteogenesis imperfecta/Ehlers-Danlos syndrome by interference with N-propeptide processing. In: *The journal of biological chemistry* 280 (19), S. 19259–19269. DOI: 10.1074/jbc.M414698200.

22. Cao, X.; Chen, D. (2005): The BMP signaling and in vivo bone formation. In: *Gene* 357 (1), S. 1–8. DOI: 10.1016/j.gene.2005.06.017.

23. Carreira, A. C.; Alves, G. G.; Zambuzzi, W. F.; Sogayar, M. C.; Granjeiro, J. M. (2014): Bone Morphogenetic Proteins: structure, biological function and therapeutic applications. In: *Archives of biochemistry and biophysics* 561, S. 64–73. DOI: 10.1016/j.abb.2014.07.011.

24. Carreira, A. C.; Lojudice, F. H.; Halcsik, E.; Navarro, R. D.; Sogayar, M. C.; Granjeiro, J. M. (2014): Bone morphogenetic proteins: facts, challenges, and future perspectives. In: *Journal of dental research* 93 (4), S. 335–345. DOI: 10.1177/0022034513518561.
25. Chen, D.; Zhao, M.; Mundy, G. R. (2004): Bone morphogenetic proteins. In: *Growth factors (Chur, Switzerland)* 22 (4), S. 233–241. DOI: 10.1080/08977190412331279890.
26. Chen, C.-H.; Chang, C.-H.; Wang, K.-C.; Su, C.-I.; Liu, H.-T.; Yu, C.-. et al. (2011): Enhancement of rotator cuff tendon-bone healing with injectable periosteum progenitor cells-BMP-2 hydrogel in vivo. In: *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy: official journal of the ESSKA* 19 (9), S. 1597–1607. DOI: 10.1007/s00167-010-1373-0.
27. Chen, B.; Li, B.; Qi, Y.-J.; Ni, Q.-B.; Pan, Z.-Q.; Wang, H.; Chen, L.-B. (2016): Enhancement of tendon-to-bone healing after anterior cruciate ligament reconstruction using bone marrow-derived mesenchymal stem cells genetically modified with bFGF/BMP2. In: *Scientific reports* 6, S. 25940. DOI: 10.1038/srep25940.
28. Chubinskaya, S.; Hurtig, M.; Rueger, D. C. (2007): OP-1/BMP-7 in cartilage repair. In: *International orthopaedics* 31 (6), S. 773–781. DOI: 10.1007/s00264-007-0423-9.
29. Cimino, F.; Volk, B.S.; Setter, D. (2010): Anterior Cruciate Ligament Injury: Diagnosis, Management and Prevention. In: *American Family Physician* 8, S. 917-922
30. Crawford, R.; Walley, G.; Bridgman, S.; Maffulli, N. (2007): Magnetic resonance imaging versus arthroscopy in the diagnosis of knee pathology, concentrating on meniscal lesions and ACL tears: a systematic review. In: *British medical bulletin* 84, S. 5–23. DOI: 10.1093/bmb/ldm022.
31. Crawford, N. s.; Waterman, B. R.; Lubowitz, J. H. (2013): Long-term failure of anterior cruciate ligament reconstruction. In: *Arthroscopy: the journal of arthroscopic & related surgery: official publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association* 29 (9), S. 1566–1571. DOI: 10.1016/j.arthro.2013.04.014.
32. Dalgleish, R. (1997): The human type I collagen mutation database. In: *Nucleic Acids Research* 25 (1), S. 181–187. DOI: 10.1093/nar/25.1.181.

33. De Rooster, H.; De Bruin, T.; Van Bree, H. (2006): Morphologic and functional features of the canine cruciate ligaments. In: *Vet. Surg.* 35, S. 769–780. DOI: 10.1111/j.1532-950X.2006.00221.x.
34. De Wet, W.; Bernard, M.; Benson-Chanda, V.; Chu, M.-L.; Dickson, L.; Weil, D.; Ramirez, F. (1987): Organization of the Human Pro- α 2(I) Collagen Gene. In: *The journal of biological chemistry* 262 (33), S. 16032–16036.
35. Deehan, D. J.; Cawston, T. E. (2005): The biology of integration of the anterior cruciate ligament. In: *The Journal of bone and joint surgery. British volume* 87 (7), S. 889–895. DOI: 10.1302/0301-620X.87B7.16038.
36. Desai, N.; Björnsson, H.; Musahl, V.; Bhandari, M.; Petzold, M.; Fu, F. H.; Samuelsson, K. (2014): Anatomic single- versus double-bundle ACL reconstruction: a meta-analysis. In: *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy: official journal of the ESSKA* 22 (5), S. 1009–1023. DOI: 10.1007/s00167-013-2811-6.
37. Dytfeld, J.; Marcinkowska, M.; Drweska-Matelska, N.; Michalak, M.; Horst-Sikorska, W.; Slomski, R. (2016): Association analysis of the COL1A1 polymorphism with bone mineral density and prevalent fractures in Polish postmenopausal women with osteoporosis. In: *Archives of medical science: AMS* 12 (2), S. 288–294. DOI: 10.5114/aoms.2016.59253.
38. Egle, B. E.; Kučinskas, V. (2000): Strategy for prenatal diagnosis of osteogenesis imperfecta by linkage analysis to the type I collagen loci COL1A1 and COL1A2. In: *Med Sci Monit* 6 (2), S. 217–226.
39. Eichhorn, H. J.; Birkner, W. (2006): Aktuelle Trends zur Rekonstruktion des vorderen Kreuzbandes. In: *Stiftung zur Förderung der Arthroskopie* (19), S. 1–20.
40. Eliasson, P.; Fahlgren, A.; Aspenberg, P. (2008): Mechanical load and BMP signaling during tendon repair: a role for follistatin? In: *Clinical orthopaedics and related research* 466 (7), S. 1592–1597. DOI: 10.1007/s11999-008-0253-0

41. Feugaing, D. D. S.; Götte, M; Viola, M. (2013): More than matrix: the multifaceted role of decorin in cancer. In: *European journal of cell biology* 92 (1), S. 1–11. DOI: 10.1016/j.ejcb.2012.08.004.
42. Font Tellado, S.; Balmayor, E. R.; van Griensven, M. (2015): Strategies to engineer tendon/ligament-to-bone interface: Biomaterials, cells and growth factors. In: *Advanced drug delivery reviews* 94, S. 126–140. DOI: 10.1016/j.addr.2015.03.004.
43. Frobell, R. B.; Roos, E. M.; Roos, H. P.; Ranstam, J.; Lohmander, L. S. (2010): A Randomized Trial of Treatment for Acute Anterior Cruciate Ligament Tears. In: *The New England Journal of Medicine* 363 (4), S. 331–342.
44. Frobell, R. B.; Roos, H. P.; Roos, E. M.; Roemer, F. W.; Ranstam, J.; Lohmander, L. S. (2013): Treatment for acute anterior cruciate ligament tear: five year outcome of randomised trial. In: *BMJ (Clinical research ed.)* 346, f232. DOI: 10.1136/bmj.f232.
45. Fu, R.; Selph, S.; McDonagh, M.; Peterson, K.; Tiwari, A.; Chou, R.; Helfand, M. (2013): Effectiveness and harms of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in spine fusion. A systematic review and meta-analysis. In: *The Spine Journal* 158(12), S. 890–902.
46. Geiger, M.; Li R. H.; Friess W. (2003): Collagen sponges for bone regeneration with rhBMP-2. In: *Advanced drug delivery reviews* 55 (12), S. 1613–1629. DOI: 10.1016/j.addr.2003.08.010.
47. Georgiev, G. P.; Kotov, G.; Iliev, A.; Slavchev, S.; Ovtscharoff, W.; Landzhov, B. A. (2019): Comparative study of the epiligament of the medial collateral and the anterior cruciate ligament in the human knee. Immunohistochemical analysis of collagen type I and V and procollagen type III. In: *Ann. Anat* 224, S. 88–96. DOI: 10.1016/j.aanat.2019.04.002.
48. Gensure, R. C.; Makitie, O.; Barclay, C.; Chan, C.; Depalma, S. R.; Bastepe, M. et al. (2005): A novel COL1A1 mutation in infantile cortical hyperostosis (Caffey disease) expands the spectrum of collagen-related disorders. In: *The Journal of clinical investigation* 115 (5), S. 1250–1257. DOI: 10.1172/JCI22760.

49. George, Michael S.; Dunn, Warren R.; Spindler, Kurt P. (2006): Current concepts review: revision anterior cruciate ligament reconstruction. In: *The American journal of sports medicine* 34 (12), S. 2026–2037. DOI: 10.1177/0363546506295026.
50. Getelman, M. H.; Friedman, M. J. (1999): Revision anterior cruciate ligament reconstruction surgery. In: *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons* 7, 1999 (3), S. 189–198.
51. Gomes-Ferreira, P. H. S.; Okamoto, R.; Ferreira, S.; Oliveira, D. d.; Momesso, G. A. C.; Faverani, L. P. (2016): Scientific evidence on the use of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) in oral and maxillofacial surgery. In: *Oral and maxillofacial surgery*. DOI: 10.1007/s10006-016-0563-4.
52. Gordon, J. A.; Freedman, B. R.; Zuskov, A.; Lozzo, R. V.; Birk, D. E.; Soslowsky, L. J. (2015): Achilles tendons from decorin- and biglycan-null mouse models have inferior mechanical and structural properties predicted by an image-based empirical damage model. In: *Journal of biomechanics* 48 (10), S. 2110–2115. DOI: 10.1016/j.jbiomech.2015.02.058.
53. Gori, F.; Schipani, E.; Demay, M. B. (2001): Fibromodulin is expressed by both chondrocytes and osteoblasts during fetal bone development. In: *Journal of cellular biochemistry* 82 (1), S. 46–57.
54. Grant, S. F. A.; Reid, D. M.; Blake, G.; Herd, R.; Fogelman, I.; Ralston, S. H. (1996): Reduced bone density and osteoporosis associated with a polymorphic Sp1 binding site in the collagen type I α I gene. In: *nature genetics* 14 (2), S. 203–205.
55. Griffin, L. Y.; Albohm, M. J.; Arendt, E. A.; Bahr, R.; Beynnon, B. D.; Demaio, M. et al. (2006): Understanding and preventing noncontact anterior cruciate ligament injuries: a review of the Hunt Valley II meeting, January 2005. In: *The American journal of sports medicine* 34 (9), S. 1512–1532. DOI: 10.1177/0363546506286866.
56. Guo, X.; Wang, X. F. (2009): Signaling cross-talk between TGF-beta/BMP and other pathways. In: *Cell Res.* 19(1), S. 71-88. DOI: 10.1038/cr.2008.302.

57. Gwinn, D. E.; Wilckens, J. H.; McDevitt, E. R.; Ross, G.; Kao, T.-C. (2000): The Relative Incidence of Anterior Cruciate Ligament Injury in Men and Women at the United States Naval Academy*. In: *The American journal of sports medicine* (1), S. 98–102.
58. Haus, J.; Refior, H.J. (1987): A study of the synovial and ligamentous structure of the anterior cruciate ligament. In: *Int. Orthop.* 11, S. 117–124. DOI: 10.1007/BF00266696.
59. Hashimoto, Y.; Yoshida, G.; Toyoda, H.; Takaoka, K. (2007): Generation of tendon-to-bone interface "enthesis" with use of recombinant BMP-2 in a rabbit model. In: *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society* 25 (11), S. 1415–1424. DOI: 10.1002/jor.20447.
60. Hatamochi, A.; Hamada, T.; Yoshino, M.; Hashimoto, T. (2014): The first Japanese case of the arthrochalasia type of Ehlers-Danlos syndrome with COL1A2 gene mutation. In: *Gene* 538 (1), S. 199–203. DOI: 10.1016/j.gene.2014.01.033.
61. Hayashi, M.; Nomoto, S.; Hishida, M.; Inokawa, Y.; Kanda, M.; Okamura, Y. et al. (2014): Identification of the collagen type 1 alpha 1 gene (COL1A1) as a candidate survival-related factor associated with hepatocellular carcinoma. In: *BMC cancer* 14, S. 108. DOI: 10.1186/1471-2407-14-108.
62. Herbort, M; Lobenhoffer, P. (09/2018): DGU-Leitlinie 012-005. Vordere Kreuzbandruptur. 09/2018.
63. Hewett, T. E.; Myer, G. D.; Ford, K. R. (2006): Anterior cruciate ligament injuries in female athletes: Part 1, mechanisms and risk factors. In: *The American journal of sports medicine* 34 (2), S. 299–311. DOI: 10.1177/0363546505284183.
64. Hibino, N.; Hamada, Y.; Sairyo, K.; Yukata, K.; Sano, T.; Yasui, N. (2007): Callus formation during healing of the repaired tendon-bone junction. In: *The Journal of bone and joint surgery. British volume* 89 (11), S. 1539–1544.
65. Hildebrand, A.; Romarís, M.; Rasmussen, L. M.; Heinegård, D.; Twardzik, D. R.; Border, W. A.; Ruoslahti, E. (1994): Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor β . In: *Biochem. J.* 302 (2), S. 527–534. DOI: 10.1042/bj3020527.

66. Hjorthaug, G. A.; Madsen, J. E.; Nordsletten, L.; Reinholt, F. P.; Steen, H.; Dimmen, S. (2015): Tendon to bone tunnel healing--a study on the time-dependent changes in biomechanics, bone remodeling, and histology in a rat model. In: *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 33 (2), S. 216–223. DOI: 10.1002/jor.22756.
67. Houck, J.; Lerner, A.; Gushue, D.; Yack, H. J. (2003): Self-Reported Giving-Way Episode During a Stepping-Down Task: Case Report of a Subject With an ACL-Deficient Knee. In: *Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy* (33), S. 273–286.
68. Houck, J.; Yack, H. J. (2001): Giving Way Event During a Combined Stepping and Crossover Cutting Task in an Individual with Anterior Cruciate Ligament Deficiency. In: *Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy* (31), S. 481–495.
69. Hoyer-Kuhn, H.; Netzer, C.; Semler, O. (2015): Osteogenesis imperfecta: pathophysiology and treatment. In: *Wiener medizinische Wochenschrift (1946)* 165 (13-14), S. 278–284. DOI: 10.1007/s10354-015-0361-x.
70. Hupfeld, M.: Die Geschichte der Hox-Gene. Zentrale für Unterrichtsmedien im Internet e.V. Online verfügbar unter <http://www.zum.de/Faecher/Materialien/hupfeld/Genetik/hox-gen-geschichte/hox-gen-geschichte.htm>, zuletzt geprüft am 18.08.2017.
71. Ito, Y.; Toriuchi, N.; Yoshitaka, T.; Ueno-Kudoh, H.; Sato, T.; Yokoyama, S. et al. (2010): The Mohawk homeobox gene is a critical regulator of tendon differentiation. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (23), S. 10538–10542. DOI: 10.1073/pnas.1000525107.
72. Jansohn, M. (2007): Gentechnische Methoden. Vierte Aufl. München: Elsevier Verlag.
73. Jarvelainen, H.; Sainio, A.; Wight, T. N. (2015): Pivotal role for decorin in angiogenesis. In: *Matrix biology: journal of the International Society for Matrix Biology* (43), S. 15–26. DOI: 10.1016/j.matbio.2015.01.023.
74. Jian, J.; Zheng, Z.; Zhang, K.; Rackohn, T. M.; Hsu, C.; Levin, Andrew et al. (2013): Fibromodulin promoted in vitro and in vivo angiogenesis. In: *Biochemical and biophysical research communications* 436 (3), S. 530–535. DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.06.005.

75. Jin, G.-M.; Zhao, X.-J.; Chen, A.-M.; Chen, Y.-X.; Li, Q. (2016): Association of COL1A1 polymorphism with high myopia: a Meta-analysis. In: *International journal of ophthalmology* 9 (4), S. 604–609. DOI: 10.18240/ijo.2016.04.22.
76. Johnson, D. L.; Coen, M. J. (1995): Revision ACL surgery. Etiology, indications, techniques, and results. In: *Am journal of knee surgery*, 8 (4), S. 155–167.
77. Johnson, D. L.; Swenson, T. M.; Irrgang, J. J.; Fu, F. H.; Harner, C. D. (1996): Revision Anterior Cruciate Ligament Surgery: Experience from Pittsburgh. In: *Clinical orthopaedics and related research* (325), S. 100–109.
78. Jones, J. R.; Allum, R. L. (1989): Acute traumatic haemarthrosis of the knee: expectant treatment or arthroscopy? In: *Annals of the Royal College of Surgeons of England* (71), S. 40–43.
79. Kaeding, C. C.; Aros, B.; Pedroza, A.; Pifel, E.; Amendola, A.; Andrish, J. T. et al. (2011): Allograft Versus Autograft Anterior Cruciate Ligament Reconstruction: Predictors of Failure from a MOON Prospective Longitudinal Cohort. In: *Sports health* 3 (1), S. 73–81. DOI: 10.1177/1941738110386185.
80. Kalamajski, S.; Oldberg, A. (2007): Fibromodulin binds collagen type I via Glu-353 and Lys-355 in leucine-rich repeat 11. In: *The journal of biological chemistry* 282 (37), S. 26740–26745. DOI: 10.1074/jbc.M704026200.
81. Kaps, C; Bramlage, C; Smolian, H et al. (2002): Bone morphogenetic proteins promote cartilage differentiation and protect engineered artificial cartilage from fibroblast invasion and destruction. In: *Arthritis Rheum* 46(1), S. 149-162. doi:10.1002/1529-0131(200201)46:1<149::AID-ART10058>3.0.CO;2-W
82. Khan, S. N.; Lane, J. M. (2004): The use of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) in orthopaedic applications. In: *Expert opinion on biological therapy* 4 (5), S. 741–748. DOI: 10.1517/14712598.4.5.741.
83. Klatte-Schulz, F; Pauly, S; Scheibel, M et al. (2013): Characteristics and stimulation potential with BMP-2 and BMP-7 of tenocyte-like cells isolated from the rotator cuff of female donors. In: *PLoS One* 8(6), e67209. DOI:10.1371/journal.pone.0067209

84. Kraeutler, M. J.; Bravman, J. T.; McCarty, E. C. (2013): Bone-patellar tendon-bone autograft versus allograft in outcomes of anterior cruciate ligament reconstruction: a meta-analysis of 5182 patients. In: *The American journal of sports medicine* 41 (10), S. 2439–2448. DOI: 10.1177/0363546513484127.
85. Krajnc, Z.; Vogrin, M.; Recnik, G.; Crnjac, A.; Drobic, M.; Antolic, V. (2010): Increased risk of knee injuries and osteoarthritis in the non-dominant leg of former professional football players. In: *Wiener klinische Wochenschrift* 122 Suppl 2, S. 40–43. DOI: 10.1007/s00508-010-1341-1.
86. Kuikka, P.-I.; Pihlajamäki, H. K.; Mattila, V. M. (2013): Knee injuries related to sports in young adult males during military service - incidence and risk factors. In: *Scandinavian journal of medicine & science in sports* 23 (3), S. 281–287. DOI: 10.1111/j.1600-0838.2011.01397.x.
87. Kurt-Sirin, O.; Yilmaz-Aydogan, H.; Uyar, Me.; Seyhan, M.-F.; Isbir, T.; Can, A.(2014): Combined effects of collagen type I alpha1 (COL1A1) Sp1 polymorphism and osteoporosis risk factors on bone mineral density in Turkish postmenopausal women. In: *Gene* 540 (2), S. 226–231. DOI: 10.1016/j.gene.2014.02.028.
88. Kwansa, A. L.; Vita, R. d.; Freeman, J. W. (2014): Mechanical recruitment of N- and C-crosslinks in collagen type I. In: *Matrix biology: journal of the International Society for Matrix Biology* 34, S. 161–169. DOI: 10.1016/j.matbio.2013.10.012.
89. Lee, W. J.; Ahn, H. M.; Roh, H.; Na, Y.; Choi, I.-K.; Lee, J. H. et al. (2015): Decorin-expressing adenovirus decreases collagen synthesis and upregulates MMP expression in keloid fibroblasts and keloid spheroids. In: *Experimental dermatology* 24 (8), S. 591–597. DOI: 10.1111/exd.12719.
90. Liu, W.; Watson, S. S.; Lan, Y.; Keene, D. R.; Ovitt, C. E.; Liu, H. et al. (2010): The atypical homeodomain transcription factor Mohawk controls tendon morphogenesis. In: *Molecular and cellular biology* 30 (20), S. 4797–4807. DOI: 10.1128/MCB.00207-10.
91. Lobenhoffer, P. (1999): Kniebandverletzungen. In: *Der Chirurg* (70), S. 219–230.
92. Lovric, V.; Chen, D.; Yu, Y.; Oliver, R. A.; Genin, F.; Walsh, W. R. (2012): Effects of demineralized bone matrix on tendon-bone healing in an intra-articular rodent model. In:

- The American journal of sports medicine* 40 (10), S. 2365–2374. DOI: 10.1177/0363546512457648.
93. Lüllmann-Rauch, R. (2003, 2009): Taschenlehrbuch. Histologie. 3. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
 94. Luyten, F. P.; Cunningham, N. S.; Ma, S.; Muthukumara, N.; Hammonds, R. G.; Nevins, W. B.; Woods, W. I.; Reddi, A. H. (1989): Purification and Partial Amino Acid Sequence of Osteogenin, a Protein Initiating Bone Differentiation. In: *The journal of biological chemistry* 264 (23), S. 13377–13380.
 95. MacKay, J. W.; Whitehead, H.; Toms, A. P. (2014): Radiological evidence for the triple bundle anterior cruciate ligament. In: *Clinical anatomy (New York, N.Y.)* 27 (7), S. 1097–1102. DOI: 10.1002/ca.22420.
 96. Mae, T.; Shino, K.; Miyama, T.; Shinjo, H.; Ochi, T.; Yoshikawa, H.; Fujie, H. (2001): Single– versus two–femoral socket anterior cruciate ligament reconstruction technique. In: *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery* 17 (7), S. 708–716. DOI: 10.1053/jars.2001.25250.
 97. Magnussen, R. A.; Taylor, D. C.; Toth, A. P.; Garrett, W. E. (2012): ACL graft failure location differs between allografts and autografts. In: *Sports medicine, arthroscopy, rehabilitation, therapy & technology : SMARTT* 4 (1), S. 22. DOI: 10.1186/1758-2555-4-22.
 98. Mall, N. A.; Chalmers, P. N.; Moric, Mario; Tanaka, Miho J.; Cole, Brian J.; Bach, Bernard R.; Paletta, George A. (2014): Incidence and trends of anterior cruciate ligament reconstruction in the United States. In: *The American journal of sports medicine* 42 (10), S. 2363–2370. DOI: 10.1177/0363546514542796.
 99. Mandal, C. C.; Das, F.; Ganapathy, S.; Harris, S. E.; Choudhury, G. G.; Ghosh-Choudhury, N. (2016): Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) Activates NFATc1 Transcription Factor via an Autoregulatory Loop Involving Smad/Akt/Ca²⁺ Signaling. In: *The journal of biological chemistry* 291 (3), S. 1148–1161. DOI: 10.1074/jbc.M115.668939.

100. Marumo, K.; Saito, M.; Yamagishi, T.; Fujii, K. (2005): The "ligamentization" process in human anterior cruciate ligament reconstruction with autogenous patellar and hamstring tendons: a biochemical study. In: *The American journal of sports medicine* 33 (8), S. 1166–1173. DOI: 10.1177/0363546504271973.
101. Mather, R. C.; Koenig, L.; Kocher, M. S.; Dall, T. M.; Gallo, P.; Scott, D. J. et al. (2013): Societal and economic impact of anterior cruciate ligament tears. In: *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 95 (19), S. 1751–1759. DOI: 10.2106/JBJS.L.01705.
102. Mayr, C.; Bund, D.; Schlee, M.; Moosmann, A.; Kofler, D. M.; Hallek, M.; Wendtner, C.-M. (2005): Fibromodulin as a novel tumor-associated antigen (TAA) in chronic lymphocytic leukemia (CLL), which allows expansion of specific CD8⁺ autologous T lymphocytes. In: *Blood* 105 (4), S. 1566–1573. DOI: 10.1182/blood-2004-04-1233.
103. McBride, O. W.; Fisher, L. W.; Young, M. F. (1990): Localization of PGI (Biglycan, BGN) and PGII (Decorin, DCN, PG-40) Genes on Human Chromosomes Xq13-qter and 12q, Respectively. In: *Genomics* 6 (2), S. 219–225.
104. Meenakshi, J.; Vidyameenakshi, S.; Ananthram, D.; Ramakrishnan, K. M.; Jayaraman, V.; Babu, M. (2009): Low decorin expression along with inherent activation of ERK1,2 in ear lobe keloids. In: *Burns: journal of the International Society for Burn Injuries* 35 (4), S. 519–526. DOI: 10.1016/j.burns.2008.07.012.
105. Ménétrey, J.; Duthon, V. B.; Laumonier, T.; Fritschy, D. (2008): "Biological failure" of the anterior cruciate ligament graft. In: *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy: official journal of the ESSKA* 16 (3), S. 224–231. DOI: 10.1007/s00167-007-0474-x.
106. Merline, R.; Moreth, K.; Beckmann, J.; Nastase, M. V.; Zeng-Brouwers, J.; Tralhão, J. G.; Lemarchand, P.; Pfeilschifter, J.; Schaefer, R. M.; Iozzo, R. V.; Schaefer, L. (2011): Signaling by the Matrix Proteoglycan Decorin Controls Inflammation and Cancer Through PDCD4 and MicroRNA-21. In: *Science Signaling* 5 (199), S. 1–14.
107. Mihata, L. C. S.; Beutler, A. I.; Boden, B. P. (2006): Comparing the incidence of anterior cruciate ligament injury in collegiate lacrosse, soccer, and basketball players: implications for anterior cruciate ligament mechanism and prevention. In: *The American journal of sports medicine* 34 (6), S. 899–904. DOI: 10.1177/0363546505285582.

108. Mihelic, R. (2004): Bone Morphogenetic Protein-7 (Osteogenic Protein-1) Promotes Tendon Graft Integration in Anterior Cruciate Ligament Reconstruction in Sheep. In: *American Journal of Sports Medicine* 32 (7), S. 1619–1625. DOI: 10.1177/0363546504263703.
109. Mikaelsson, E.; Danesh-Manesh, A. H.; Luppert, A.; Jeddi-Tehrani, M.; Rezvany, Mohammad-Reza; Sharifian, Ramazan Ali et al. (2005): Fibromodulin, an extracellular matrix protein: characterization of its unique gene and protein expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma. In: *Blood* 105 (12), S. 4828–4835. DOI: 10.1182/blood-2004-10-3941.
110. Mitchell, A. L.; Judis, L. M.; Schwarze, U.; Vaynshtok, P. M.; Drumm, M. L.; Byers, P. H. (2012): Characterization of tissue-specific and developmentally regulated alternative splicing of exon 64 in the COL5A1 gene. In: *Connective tissue research* 53 (3), S. 267–276. DOI: 10.3109/03008207.2011.636160.
111. Miyazono, K.; Maeda, S.; Imamura, T. (2005): BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. In: *Cytokine & growth factor reviews* 16 (3), S. 251–263. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2005.01.009.
112. Mondal, B.; Patil, V.; Shwetha, S. D.; Sravani, K.; Hegde, A. S.; Arivazhagan, A. et al. (2016): Integrative functional genomic analysis identifies epigenetically regulated fibromodulin as an essential gene for glioma cell migration. In: *Oncogene*. DOI: 10.1038/onc.2016.176.
113. Monroe, G. R.; Harakalova, M.; van der Crabben, S. N.; Majoor-Krakauer, D.; Bertoli-Avella, A. M.; Moll, F. L. et al. (2015): Familial Ehlers-Danlos syndrome with lethal arterial events caused by a mutation in COL5A1. In: *American journal of medical genetics. Part A* 167 (6), S. 1196–1203. DOI: 10.1002/ajmg.a.36997.
114. Mülhardt, C. (2009): Der Experimentator. Molekularbiologie/ Genomics. Sechste Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
115. Murawski, C. D.; Wolf, M. R.; Araki, D.; Muller, B.; Tashman, S.; Fu, F. H. (2013): Anatomic Anterior Cruciate Ligament Reconstruction: Current Concepts and Future Perspective. In: *Cartilage* 4 (3 Suppl), 27S-37S. DOI: 10.1177/1947603513486557.

116. Navali, A. M.; Bazavar, M.; Mohseni, M. A.; Safari, B.; Tabrizi, A. (2013): Arthroscopic Evaluation of the Accuracy of Clinical Examination versus MRI in Diagnosing Meniscus Tears and Cruciate Ligament Ruptures. In: *Archives of Iranian Medicine* 16 (4), S. 229–232.
117. Nemani, N.; Santo, L.; Eda, H.; Cirstea, D.; Mishima, Y.; Patel, C. et al. (2015): Role of decorin in multiple myeloma (MM) bone marrow microenvironment. In: *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 30 (3), S. 465–470. DOI: 10.1002/jbmr.2371.
118. Nikolaou, V. S.; Efstathopoulos, N.; Sourlas, L.; Pilichou, A.; Papachristou, G. (2009): Anatomic double-bundle versus single-bundle ACL reconstruction: a comparative biomechanical study in rabbits. In: *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy: official journal of the ESSKA* 17 (8), S. 895–906. DOI: 10.1007/s00167-009-0754-8.
119. Niyibizi, C.; Sagarrigo Visconti, C.; Gibson, G.; Kavalkovich, K. (1996): Identification and immunolocalization of type X collagen at the ligament-bone interface. In: *Biochem Biophys Res Commun.* 222 (2), S. 584–589. DOI:10.1006/bbrc.1996.0787
120. Nordenvall, R.; Bahmanyar, S.; Adami, J.; Stenros, C.; Wredmark, T.; Felländer-Tsai, L. (2012): A population-based nationwide study of cruciate ligament injury in Sweden, 2001-2009: incidence, treatment, and sex differences. In: *The American journal of sports medicine* 40 (8), S. 1808–1813. DOI: 10.1177/0363546512449306.
121. Nyman, M. C.; Sainio, A. O.; Pennanen, M. M.; Lund, R. J.; Vuorikoski, S.; Sundstrom, J. T. T.; Jarvelainen, H. T. (2015): Decorin in Human Colon Cancer: Localization In Vivo and Effect on Cancer Cell Behavior In Vitro. In: *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society* 63 (9), S. 710–720. DOI: 10.1369/0022155415590830.
122. Olsen, O.-E. (2004): Injury Mechanisms for Anterior Cruciate Ligament Injuries in Team Handball: A Systematic Video Analysis. In: *American Journal of Sports Medicine* 32 (4), S. 1002–1012. DOI: 10.1177/0363546503261724.
123. Onizuka, N.; Ito, Y.; Inagawa, M.; Nakahara, H.; Takada, S.; Lotz, M. et al. (2014): The Mohawk homeobox transcription factor regulates the differentiation of tendons and volar

plates. In: *Journal of orthopaedic science: official journal of the Japanese Orthopaedic Association* 19 (1), S. 172–180. DOI: 10.1007/s00776-013-0485-z.

124. Oryan, A.; Alidadi, S.; Moshiri, A.; Bigham-Sadegh, A. (2014): Bone morphogenetic proteins: a powerful osteoinductive compound with non-negligible side effects and limitations. In: *BioFactors (Oxford, England)* 40 (5), S. 459–481. DOI: 10.1002/biof.1177.
125. Otabe, K.; Nakahara, H.; Hasegawa, A.; Matsukawa, T.; Ayabe, F.; Onizuka, N. et al. (2015): Transcription factor Mohawk controls tenogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells in vitro and in vivo. In: *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society* 33 (1), S. 1–8. DOI: 10.1002/jor.22750.
126. Ozeki, N.; Muneta, T.; Koga, H.; Katagiri, H.; Otabe, K.; Okuno, M. et al. (2013): Transplantation of Achilles tendon treated with bone morphogenetic protein 7 promotes meniscus regeneration in a rat model of massive meniscal defect. In: *Arthritis and rheumatism* 65 (11), S. 2876–2886. DOI: 10.1002/art.38099.
127. Pan, X.; Chen, Z.; Huang, R.; Yao, Y.; Ma, G. (2013): Transforming growth factor beta1 induces the expression of collagen type I by DNA methylation in cardiac fibroblasts. In: *PloS one* 8 (4), e60335. DOI: 10.1371/journal.pone.0060335.
128. Parkkari, J.; Pasanen, K.; Mattila, V. M.; Kannus, P.; Rimpelä, A. (2008): The risk for a cruciate ligament injury of the knee in adolescents and young adults: a population-based cohort study of 46 500 people with a 9-year follow-up. In: *British journal of sports medicine* 42 (6), S. 422–426. DOI: 10.1136/bjsm.2008.046185.
129. Patel, S. R.; Dressler, G. R. (2005): BMP7 signaling in renal development and disease. In: *Trends in molecular medicine* 11 (11), S. 512–518. DOI: 10.1016/j.molmed.2005.09.007.
130. Pauly, S.; Klatte, F.; Strobel, C. et al. (2012): BMP-2 and BMP-7 affect human rotator cuff tendon cells in vitro. In: *J Shoulder Elbow Surg.* 21 (4), S. 464–473. DOI: 10.1016/j.jse.2011.01.015.

131. Petersen, W.; Tillmann, B. (1999) Structure and vascularization of the cruciate ligaments of the human knee joint. In: *Anat Embryol (Berl)*. 200 (3), S. 325-334. DOI:10.1007/s004290050283
132. Poon, B.; Kha, T.; Tran, S.; Dass, C. R. (2016): Bone morphogenetic protein-2 and bone therapy: successes and pitfalls. In: *The Journal of pharmacy and pharmacology* 68 (2), S. 139–147. DOI: 10.1111/jphp.12506.
133. Pujol, N.; Blanchi, M. P. R.; Chambat, P. (2007): The incidence of anterior cruciate ligament injuries among competitive Alpine skiers: a 25-year investigation. In: *The American journal of sports medicine* 35 (7), S. 1070–1074. DOI: 10.1177/0363546507301083.
134. Ritelli, M.; Dordoni, C.; Venturini, M.; Chiarelli, N.; Quinzani, S.; Traversa, M. et al. (2013): Clinical and molecular characterization of 40 patients with classic Ehlers-Danlos syndrome: identification of 18 COL5A1 and 2 COL5A2 novel mutations. In: *Orphanet journal of rare diseases* 8, S. 58. DOI: 10.1186/1750-1172-8-58.
135. Rodeo, S. A.; Arnoczky, S. P.; Torzilli, P. A.; Hidaka, C.; Warren, R. F. (1993): Tendon-healing in a bone tunnel: a biomechanical and histological study in the dog. In: *The Journal of bone and joint surgery. Incorporated* 75 (12), S. 1795–1803.
136. Rodeo, S. A.; Suzuki, K.; Deng, X.-h.; Wozney, J.; Warren, R. F. (1999): Use of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 to Enhance Tendon Healing in a Bone Tunnel. In: *The American journal of sports medicine* 27 (4), S. 476–488.
137. Rosen, V. (2009): BMP2 signaling in bone development and repair. In: *Cytokine & growth factor reviews* 20 (5-6), S. 475–480. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2009.10.018.
138. Roughley, P. J.; White, R. J.; Cs-Szabó, G.; Mort, J. S. (1996): Changes with age in the structure of fibromodulin in human articular cartilage. In: *Osteoarthritis and Cartilage* 4 (3), S. 153–161. DOI: 10.1016/S1063-4584(96)80011-2.
139. Rowe, D. W.; Shapiro, J. R.; Poirier, M.; Schlesinger, S. (1985): Diminished type I collagen synthesis and reduced alpha 1(I) collagen messenger RNA in cultured fibroblasts from patients with dominantly inherited (type I) osteogenesis imperfecta. In: *The Journal of clinical investigation* 76 (2), S. 604–611. DOI: 10.1172/JCI112012.

140. Ryan, J.; Magnussen, R. A.; Cox, C. L.; Hurbanek, J. G.; Flanigan, D. C.; Kaeding, C. C. (2014): ACL reconstruction: do outcomes differ by sex? A systematic review. In: *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 96 (6), S. 507–512. DOI: 10.2106/JBJS.M.00299.
141. Saini, S.; Duraisamy, A. J.; Bayen, S.; Vats, P.; Singh, S. B. (2015): Role of BMP7 in appetite regulation, adipogenesis, and energy expenditure. In: *Endocrine* 48 (2), S. 405–409. DOI: 10.1007/s12020-014-0406-8.
142. Samitier, G.; Marcano, A. I.; Alentorn-Geli, E.; Cugat, R.; Farmer, K. W.; Moser M. W. (2015): Current concept review. Failure of Anterior Cruciate Ligament Reconstruction. Quality and process improvement in orthopedics. In: *Archives of Bone and Joint Surgery* 3 (4), S. 220-240. DOI: 10.2147/ORR.S92216.
143. Sampath, T. K.; Reddi, A. H. (1981): Dissociative extraction and reconstitution of extracellular matrix components involved in local bone differentiation. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 78 (12), S. 7599–7603. DOI: 10.1073/pnas.78.12.7599.
144. Scheffler, S. U.; Unterhauser, F. N.; Weiler, A. (2008): Graft remodeling and ligamentization after cruciate ligament reconstruction. In: *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy: official journal of the ESSKA* 16 (9), S. 834–842. DOI: 10.1007/s00167-008-0560-8.
145. Schonherr, E.; Broszat, M.; Brandan, E.; Bruckner, P.; Kresse, H. (1998): Decorin core protein fragment Leu155-Val260 interacts with TGF-beta but does not compete for decorin binding to type I collagen. In: *Archives of biochemistry and biophysics* 355 (2), S. 241–248. DOI: 10.1006/abbi.1998.0720.
146. Schünke, M.; Schulte, E.; Schumacher, U. (2005, 2007): Prometheus. Allgemeiner Anatomie und Bewegungssystem. Lernatlas der Anatomie. Zweite Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
147. Schwarting, T.; Benölken, M.; Ruchholtz, S.; Frink, M.; Lechler, P. (2015): Bone morphogenetic protein-7 enhances bone-tendon integration in a murine in vitro co-culture model. In: *International orthopaedics* 39 (4), S. 799–805. DOI: 10.1007/s00264-015-2688-8.

148. Schwartin, T.; Lechler, P.; Struwe, J.; Ambrock, M.; Frangen, T. M.; Ruchholtz, S.; Ziring, E.; Frink, M. (2015): Bone Morphogenetic Protein 7 (BMP-7) Influences Tendon-Bone Integration In Vitro. In: *PLoS ONE* 10(2): e0116833. DOI: 10.1371/journal.pone.0116833. eCollection 2015.
149. Schwarting, T.; Pretzsch, S.; Debus, F.; Ruchholtz, S.; Lechler, P. (2015): The effect of cyclooxygenase inhibition on tendon-bone healing in an in vitro co-culture model. In: *Mediators Inflamm.* 2015;2015:926369. doi: 10.1155/2015/926369. Epub 2015 May 6.
150. Schwarting, T.; Schenk, D.; Frink, M.; Benölken, M.; Steindor, F.; Oswald, M. et al. (2016): Stimulation with bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) enhances bone-tendon integration in vitro. In: *Connective tissue research* 57 (2), S. 99–112. DOI: 10.3109/03008207.2015.1087516.
151. Shafizadeh, S.; Schneider, M. M.; Bouillon, B. (2014): Injuries of the anterior cruciate ligament in athletes. In: *Chirurg*, 85 (10), S. 888-894.
152. Shaw, H. M.; Benjamin, M. (2007): Structure-function relationships of entheses in relation to mechanical load and exercise. In: *Scandinavian journal of medicine & science in sports* 17 (4), S. 303–315. DOI: 10.1111/j.1600-0838.2007.00689.x.
153. Shi, S.; de Gorter, D. J. J.; Hoogaars, W. M. H.; t Hoen, P. A. C.; ten Dijke, P. (2013): Overactive bone morphogenetic protein signaling in heterotopic ossification and Duchenne muscular dystrophy In: *Cellular And Molecular Life Sciences* 70(3), S. 407-423.
154. Shi, X.; Liang, W.; Yang, W.; Xia, R.; Song, Y. (2015): Decorin is responsible for progression of non-small-cell lung cancer by promoting cell proliferation and metastasis. In: *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 36 (5), S. 3345–3354. DOI: 10.1007/s13277-014-2968-8.
155. Shi, X.; Lu, Y.; Wang, Y.; Zhang, Y.-A.; Teng, Y.; Han, W. et al. (2015): Heterozygous mutation of c.3521CT in COL1A1 may cause mild osteogenesis imperfecta/Ehlers-Danlos syndrome in a Chinese family. In: *Intractable & rare diseases research* 4 (1), S. 49–53. DOI: 10.5582/irdr.2014.01039.

156. Solomon, D. H.; Simel, D. L.; Bates, David W.; Katz, J. N.; Schaffer, J. L. (2001): Does This Patient Have a Torn Meniscus or Ligament of the Knee? Value of the Physical Examination. In: *The Rational Clinical Examination* (286), S. 1610–1620.
157. Stamov, D. R.; Stock, E.; Franz, C. M.; Jahnke, T.; Haschke, H. (2015): Imaging collagen type I fibrillogenesis with high spatiotemporal resolution. In: *Ultramicroscopy* 149, S. 86–94. DOI: 10.1016/j.ultramic.2014.10.003.
158. Starman, B. J.; Eyre, D.; Charbonneau, H.; Harrylock, M.; Weis, M. A.; Weiss, L. et al. (1989): Osteogenesis imperfecta. The position of substitution for glycine by cysteine in the triple helical domain of the pro alpha 1(I) chains of type I collagen determines the clinical phenotype. In: *The Journal of clinical investigation* 84 (4), S. 1206–1214. DOI: 10.1172/JCI114286.
159. Sun, M.; Connizzo, B. K.; Adams, S. M.; Freedman, B. R.; Wenstrup, R. J.; Soslowsky, L. J.; Birk, D. E. (2015): Targeted deletion of collagen V in tendons and ligaments results in a classic Ehlers-Danlos syndrome joint phenotype. In: *The American journal of pathology* 185 (5), S. 1436–1447. DOI: 10.1016/j.ajpath.2015.01.031.
160. Swenson, D. M.; Collins, C. L.; Best, T. M.; Flanigan, D. C.; Fields, S. K.; Comstock, R. D. (2013): Epidemiology of knee injuries among U.S. high school athletes, 2005/2006-2010/2011. In: *Medicine and science in sports and exercise* 45 (3), S. 462–469. DOI: 10.1249/MSS.0b013e318277acca.
161. Sztrolovics, R.; Chen, X.-N.; Grover, J.; Roughley, P. J.; Korenberg, J. R. (1994): Localization of the Human Fibromodulin Gene (FMOD) to Chromosome 1q32 and Completion of the cDNA Sequence. In: *Genomics* 23 (3), S. 715–717.
162. Tantisricharoenkul, G.; Linde-Rosen, M.; Araujo, P.; Zhou, J.; Smolinski, P.; Fu, F. H. (2013): Anterior cruciate ligament: an anatomical exploration in humans and in a selection of animal species. In: *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy: official journal of the ESSKA* 22 (5), S. 961–971. DOI: 10.1007/s00167-013-2463-6.
163. Thomas, S.; Pullagura, M.; Robinson, E.; Cohen, A.; Banaszkiwicz, P. (2007): The value of magnetic resonance imaging in our current management of ACL and meniscal

injuries. In: *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy: official journal of the ESSKA* 15 (5), S. 533–536. DOI: 10.1007/s00167-006-0259-7.

164. Tiamklang, T.; Sumanont, S.; Foocharoen, T.; Laopaiboon, M. (2012): Double-bundle versus single-bundle reconstruction for anterior cruciate ligament rupture in adults. In: *The Cochrane database of systematic reviews* 11, CD008413. DOI: 10.1002/14651858.CD008413.pub2
165. Trummer, T.; Brenner, R.; Just, W.; Vogel, W.; Kennerknecht, I. (2001): Recurrent mutations in the COL1A2 gene in patients with osteogenesis imperfecta. In: *Clinical Genetics* 59 (5), S. 338–343.
166. Tsumaki, N.; Yoshikawa, H. (2005): The role of bone morphogenetic proteins in endochondral bone formation. In: *Cytokine & growth factor reviews* 16 (3), S. 279–285. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2005.04.001.
167. Urist, M. R. (1965): Bone: Formation by Autoinduction. In: *Science* 150 (3698), S. 893–899.
168. Van Eck, C. F.; Kropf, E. J.; Romanowski, J. R.; Lesniak, B. P.; Tranovich, M. J.; van Dijk, C. N.; Fu, F. H. (2011): ACL graft re-rupture after double-bundle reconstruction: factors that influence the intra-articular pattern of injury. In: *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy: official journal of the ESSKA* 19 (3), S. 340–346. DOI: 10.1007/s00167-010-1297-8.
169. Wan, M.; Cao, X. (2005): BMP signaling in skeletal development. In: *Biochemical and biophysical research communications* 328 (3), S. 651–657. DOI: 10.1016/j.bbrc.2004.11.067.
170. Wang, I. E.; Shan, J.; Choi, R.; Oh, S.; Kepler, C. K.; Chen, F. H.; Lu, H. H. (2007): Role of osteoblast-fibroblast interactions in the formation of the ligament-to-bone interface. In: *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society* 25 (12), S. 1609–1620. DOI: 10.1002/jor.20475.
171. Weil, D.; D'Alessio, M.; Ramirez, F.; Eyre, D. R. (1990): Structural and Functional Characterization of a Splicing- Mutation in the Pro- α 2(I) Collagen Gene of an Ehlers-

- Danlos Type VII Patient. In: *The journal of biological chemistry* 265 (26), S. 16007–16011.
172. Wenstrup, R. J.; Shrago-Howe, A. W.; Lever, L. W.; Phillips, C. L.; Byers, P. H.; Cohn, D. H. (1991): The Effects of Different Cysteine for Glycine Substitutions within $\alpha 2(I)$ Chains. In: *The American journal of sports medicine* 266 (4), S. 2590–2594.
 173. White, A. P.; Vaccaro, A. R.; Hall, J. A.; Whang, P. G.; Friel, B. C.; McKee, M. D. (2007): Clinical applications of BMP-7/OP-1 in fractures, nonunions and spinal fusion. In: *International orthopaedics* 31 (6), S. 735–741. DOI: 10.1007/s00264-007-0422-x.
 174. Witt, M. (2007): Das Erste – kompakt. Anatomie - GK1. Heidelberg: Springer Medizin Verlag.
 175. Wozney, J. M. (1992): The bone morphogenetic protein family and osteogenesis. In: *Molecular reproduction and development* 32 (160), S. 160–167.
 176. Wozney, J. M.; Rosen, V.; Celeste, A. J.; Mitsock, L. M.; Whitters, M. J.; Kriz, R. W.; Hewick, R. M.; Wang, E. A.; (1988): Novel Regulators of Bone Formation: Molecular Clones and Activities. In: *Science* 242 (4885), S. 1528–1534.
 177. Wright, R. W.; Huston, L. J.; Spindler, K. P.; Dunn, W. R.; Haas, A. K.; Allen, C. R. et al. (2010): Descriptive epidemiology of the Multicenter ACL Revision Study (MARS) cohort. In: *The American journal of sports medicine* 38 (10), S. 1979–1986. DOI: 10.1177/0363546510378645.
 178. Yagi, M.; Wong, E. K.; Kanamori, A.; Debski, R. E.; Fu, F. H.; Woo, S. L.-Y. (2002): Biomechanical Analysis of an Anatomic Anterior Cruciate Ligament Reconstruction. In: *The American journal of sports medicine* 30 (5), S. 660–666.
 179. Yamamoto, Y.; Hsu, W.-H.; Woo, Savio L.-Y.; Van Scyoc, A. H.; Takakura, Y.; Debski, R. E. (2004): Knee Stability and Graft Function After Anterior Cruciate Ligament Reconstruction: A Comparison of a Lateral and an Anatomical Femoral Tunnel Placement. In: *American Journal of Sports Medicine* 32 (8), S. 1825–1832. DOI: 10.1177/0363546504263947.
 180. Yao, L.-W.; Wang, Q.; Zhang, L.; Zhang, C.; Zhang, B.; Zhang, Y.-J.; Feng, S.-Q. (2015): Patellar tendon autograft versus patellar tendon allograft in anterior cruciate

ligament reconstruction: a systematic review and meta-analysis. In: *European journal of orthopaedic surgery & traumatology: orthopédie traumatologie* 25 (2), S. 355–365. DOI: 10.1007/s00590-014-1481-5.

181. Ye, L.; Bokobaza, S. M.; Jiang, W. G. (2009): Bone morphogenetic proteins in development and progression of breast cancer and therapeutic potential (Review). In: *Int J Mol Med* 24 (05). DOI: 10.3892/ijmm_00000269.
182. Ye, L.; Lewis-Russell, J. M., Kyanaston, H. G.; Jiang, W. G. (2007)): Bone morphogenetic proteins and their receptor signaling in prostate cancer 22 (10), S. 1129–1147.
183. Zantop, T.; Petersen, W.; Sekiya, J. K.; Musahl, V.; Fu, F. H. (2006): Anterior cruciate ligament anatomy and function relating to anatomical reconstruction. In: *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy: official journal of the ESSKA* 14 (10), S. 982–992. DOI: 10.1007/s00167-006-0076-z.
184. Zhang, L.; Jin, A.-m.; Li, Q. (2008): Recombinant human bone morphogenetic protein-2 promotes tendon-bone healing after anterior cruciate ligament reconstruction in rabbits. In: *Journal of southern medical university* 28 (10), S. 1869–1873.
185. Zheng, Z.; Jian, J.; Velasco, O.; Hsu, C.-Y.; Zhang, K.; Levin, A. et al. (2014): Fibromodulin Enhances Angiogenesis during Cutaneous Wound Healing. In: *Plastic and reconstructive surgery. Global open* 2 (12), e275. DOI: 10.1097/GOX.0000000000000243.
186. Zheng, Z.; Lee, K. S.; Zhang, X.; Nguyen, C.; Hsu, C.; Wang, J. Z. et al. (2014): Fibromodulin-deficiency alters temporospatial expression patterns of transforming growth factor-beta ligands and receptors during adult mouse skin wound healing. In: *PloS one* 9 (6), e90817. DOI: 10.1371/journal.pone.0090817.
187. Zhu, Y.; Tang, R.-K.; Zhao, P.; Zhu, S.-S.; Li, Y.-G.; Li, J.-B. (2013): Double-bundle reconstruction results in superior clinical outcome than single-bundle reconstruction. In: *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy: official journal of the ESSKA* 21 (5), S. 1085–1096. DOI: 10.1007/s00167-012-2073-8.

9. Liste der Akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren in Marburg und Gießen die Damen und Herren:

Adamkiewicz, Bartsch, Baum, Becker, Becker, Bien, Bünemann, Cetin, Cordes, Czubayko, Daut, Dettmeyer, Dodel, Donner-Banzhoff, Engenhart-Cabillic, El-Zayat, Feuser, Frink, Fritz, Fuchs-Winkelmann, Greene, Gress, Grundmann, Hertl, Heyse, Hofmann, Hoyer, Jerrentrupp, Kann, Kircher, Köhler, Kruse, Kühne, Lechler, Lill, Lohoff, Luster, Mahnken, Maier, Maurer, Moll, Mueller, Mutters, Neubauer, Neumüller, Nimsky, Oertel, Opitz, Pagenstecher, Peterlein, Plant, Preisig-Müller, Reese, Renz, Richter, Rost, Ruchholtz, Sahmland, Schieffer, Schneider, Schratt, Schüffel, Sekundo, Sevinc, Sommer, Stiewe, Stuck, Teymoortash, Thieme, Timmesfeld, Vogelmeier, Wagner, Westermann, Wulf, Zovko

In Schwalmstadt:

Akin, Peters, Schulze

In Wuppertal:

Dotzenrath, Kusenack, Möslein, Zirngibel

10. Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei einigen Menschen bedanken, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Zuallererst danke ich Herrn Prof. Dr. Philipp Lechler, der mich als Doktorand angenommen hat und sich als Doktorvater für diese Arbeit verbürgt.

Ich bedanke mich bei Herrn Dr. Tim Schwarting, der mir als Betreuer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Herrn Dr. René Zimmermann, der die Idee des Projektes vorangetrieben und somit die Grundlage dieser Arbeit geschaffen hat.

Ich danke auch Frau Esther-Pia Jansen, die mir während der Arbeit im Labor immer wieder erklärend zur Seite stand und ohne die die Versuchsreihen niemals möglich gewesen wären.

Ein weiterer Dank geht an meinen Kommilitonen und Freund Dr. Friedrich-Anton Steindor, der in derselben Projektgruppe an einem anderen Thema forschte. Mit ihm waren die langen Tage während der Versuchsreihen immer unterhaltsam.

Ganz speziell danke ich meiner Freundin Julia Fischer, die meine Launen während des Schreibprozesses ertragen musste und es Tag für Tag aufs Neue mit mir und meinen Macken aushält.

Zuletzt möchte ich allen Menschen danken, die mir während des Studiums, davor und danach immer wieder zur Seite standen und auf die ich mich auch in schweren Zeiten verlassen konnte. Zuerst möchte ich hier meine Familie nennen, die mir alles ermöglicht hat und mir immer ein Anker war. Des Weiteren natürlich allen Freunden in Köln, Marburg, Speyer und wo auch immer. Die Unterstützung, die ich durch all diese Menschen in meinem bisherigen Wirken erfahren durfte, hat mich dahin gebracht wo ich heute bin. Dafür allen die sich angesprochen fühlen ein herzliches Dankeschön.